

Identifizierung lebensmittelrelevanter und  
humanpathogener Bakterien aus Milch und Fleisch  
mittels Raman-Mikrospektroskopie  
in Kombination mit statistischer Datenanalyse



---

seit 1558

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)*

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Ingenieurin (FH) Pharma-Biotechnologie

Susann Meisel

geboren am 15.03.1986 in Leipzig



### **Gutachter**

1. Prof. Dr. Jürgen Popp

(Institut für Physikalische Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

2. Prof. Dr. Erika Kothe

(Institut für Mikrobiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 16. Oktober 2013





# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	i
-----------------------------	---

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
--------------------------------	----------

1.1	Motivation	1
1.2	Ausgangssituation	5
1.2.1	Lebensmittelrelevante Mikroorganismen	6
1.2.2	Analyseverfahren zur Detektion von Keimen in Lebensmitteln	14
1.3	Stand der Forschung: Raman-Spektroskopie als alternative Detektionsmethode	19
1.4	Eigene Forschungsergebnisse	25
1.4.1	Detektion von <i>Bacillus</i> -Endosporen	25
1.4.2	Isolierung und Identifizierung von Milchkeimen	31
1.4.3	Detektion von pathogenen Keimen aus Fleisch	39
1.5	Resümee	44

<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>46</b>
-----------------------------------	-----------

<b>2 Veröffentlichungen .....</b>	<b>59</b>
-----------------------------------	-----------

2.1	Identification of <i>B. anthracis</i> via Raman spectroscopy and chemometric approaches	61
2.2	Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy	71
2.3	Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Detection of <i>Brucella</i> spp. in Milk	81
2.4	Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy	95

<b>3 Publikationsliste .....</b>	<b>105</b>
----------------------------------	------------

<b>4 Konferenzbeiträge .....</b>	<b>107</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>111</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>113</b>

## Abkürzungsverzeichnis

BA	Columbia Blutagar
BDC	Dichte-Gradienten-Zentrifugation (engl.: <i>buoyant density centrifugation</i> )
BHI	Hirn-Herz-Agar (engl.: <i>brain heart infusion</i> )
CaDPA	Calcium-Dipicolinat
CFU	Koloniebildende Einheiten (engl.: <i>colony forming units</i> )
CG	<i>Cereus</i> -Gruppe
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EAEC	Enter aggregative <i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
EU	Europäische Union
HACCP	Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte (engl.: <i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i> )
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IR	Infrarot
LDA	Lineare Diskriminanzanalyse
MC	Enzymatische Milchverdauung (engl.: <i>milk clearing</i> )
MHA	Müller-Hinton-Agar
NCG	Nicht <i>Cereus</i> -Gruppe
NIR	Nahes Infrarot
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: <i>principal component analysis</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
SDM	gemittelte Standardabweichung (engl.: <i>standard deviation mean</i> )
SERS	Oberflächenverstärkte Raman-Spektroskopie (engl.: <i>surface enhanced Raman spectroscopy</i> )

spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
STEC	Shigatoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
SVM	Stützvektormethode (engl.: <i>support vector machine</i> )
UHT	Ultrahocherhitzt
UTI	Harnwegsinfektion (engl.: <i>urinary tract infection</i> )
UV	Ultraviolett
VBNC	Lebend, aber nicht kultivierbar (engl.: <i>viable but nonculturable</i> )
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: <i>world health organization</i> )

---

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

### 1.1 Motivation

Die Thematik Lebensmittelsicherheit und die damit verbundene Notwendigkeit für angepasste Richtlinien und Analyseverfahren haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Anstieg lebensmittelassoziierter Infektionen spielt ebenso eine Rolle, wie die Aufklärung und das Interesse der Bevölkerung durch die zunehmende öffentliche Berichterstattung.

Die Weltgesundheitsorganisation (engl.: *world health organisation*, WHO) informiert, dass jedes Jahr 1,8 Mio. Menschen, vor allem in Entwicklungsländern, an Durchfallerkrankungen sterben [1]. Ein großer Anteil dieser Erkrankungen kann auf den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln oder Wasser zurückgeführt werden. Auch in Industrieländern kann davon ausgegangen werden, dass jährlich jeder Dritte an einer Lebensmittelinfektion erkrankt [2].

Allein in den USA werden jährlich 76 Mio. Erkrankungen durch Lebensmittelkeime, 325.000 Fälle verbunden mit Krankenhausaufenthalten und 5.000 Todesfälle erfasst [3, 4]. Durch den damit einhergehenden Personalausfall und dem hohen Bedarf an Gesundheitsmaßnahmen entstehen enorme Kosten, welche die ökonomische Produktivität und wirtschaftliche Lage stark beeinflussen [5].

Faktoren, wie ein verändertes Konsumverhalten, der Wandel in Produktion und Handel, die demografische Entwicklung, aber auch die Einstufung von Erregern als pathogene Lebensmittelkeime spielen eine entscheidende Rolle im Hinblick auf den akuten Anstieg der durch Lebensmittel verursachten Infektionen [6-8].

Vor allem auch der Wandel der Betriebsgrößen und somit die Entwicklung weg von Kleinbetrieben hin zu großen Produktions- und Industrieanlagen birgt ein enormes Risiko [9]. Deutlich kann das am Beispiel der Fleischproduktion gezeigt werden: Kleine fleischverarbeitende Betriebe werden durch große Schlachthäuser ersetzt, welche ihre Produkte nicht nur national, sondern auch international vertreiben. Damit verbunden ist die Entwicklung hin zu großen Masthöfen, welche aufgrund der hohen Anzahl von Vieh veränderte landwirtschaftliche Methoden mit sich bringen. Die Gefahr durch die Übertragung pathogener Organismen zwischen den Tieren oder durch Kreuzkontaminationen zwischen den Schlacht- und Fleischprodukten hat sich drastisch erhöht [10].

Dieser Hergang steht in einem direkten Zusammenhang mit dem ansteigenden Kontaminationsrisiko in den letzten Jahrzehnten [11] und kann auf andere Industriezweige, wie milch- und geflügelverarbeitende Produktionen, übertragen werden [12]. Auch die Möglichkeit Lebensmittel durch ausgeklügelte Verpackungen und Kühlsysteme länger haltbar zu machen, geht mit dem Risiko einher, an Kälte angepasste Erreger einen idealen Lebensraum zu bieten [10].

Die erst kürzlich zurückliegende EHEC-Epidemie 2011 in Deutschland zeigt ebenfalls exemplarisch, welche Auswirkungen unbekannte krankheitserregende Mikroben in Lebensmitteln haben können. Im geschilderten Fall waren enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), welche höchstwahrscheinlich durch Sprossengemüse übertragen wurden, Auslöser für zahlreiche Magen-Darm-Infekte [13].

Ein weiterer Aspekt der Lebensmittelsicherheit ist bedingt durch die drohende Gefahr bioterroristischer Anschläge: Terroristen können sich hochpathogene, leicht auszubringende Keime, wie beispielsweise *Bacillus anthracis* und *Brucella* spp., zunutze machen, um gezielt Lebensmittel und Wasser zu kontaminieren. Durch Auslösen einer Epidemie geht eine enorme Dynamik einher, bei der nicht nur mit einem hohen Personenausfall, sondern auch mit hohen ökonomischen und wirtschaftlichen Verlusten bis hin zum Zusammenbruch des Versorgungssystems gerechnet werden muss [14, 15].

Begründet durch die geschilderten Tatsachen sind geeignete Strategien erforderlich, um mikrobielle Erreger schnell und eindeutig zu detektieren, und so die Lebensmittel-

sicherheit von der ersten Produktionsstätte bis hin zum Konsumenten (engl.: *from farm to fork*) zu gewährleisten.

Obwohl bereits zahlreiche Analysemethoden existieren, stellt diese Aufgabe noch immer eine große Herausforderung dar. Die Ansprüche, welche die Industrie den Detektionsverfahren auferlegt, sind dabei oft durch die Komplexität der Lebensmittel begrenzt. So kann zum einen nicht von einer gleichmäßigen Verteilung der Bakterien in der Lebensmittelmatrix ausgegangen werden. Zum anderen sind neben den meist sehr wenigen pathogenen Keimen eine hohe Anzahl nicht pathogener Mikroben vorhanden, welche eine selektive Isolierung und Identifizierung erforderlich machen. Auch die Heterogenität der Lebensmittelmatrix ist problematisch, da Inhaltsstoffe, wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette, Chemikalien oder Konservierungsstoffe, die Detektionsmethoden genauso limitieren können, wie die physikalische Konsistenz oder Viskositätsunterschiede durch Fette und Öle [16].

Trotz dieser schwierigen Ausgangsbedingung sollen die Verfahren nicht nur schnell, sondern auch hochsensitiv und spezifisch sein. Zusätzlich müssen Möglichkeiten geschaffen werden, um den Kosten- und Personalaufwand zu reduzieren und Vor-Ort-Analysen zu realisieren.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Evaluierung der Raman-Mikrospektroskopie als schnelles Detektionsverfahren zur Identifizierung relevanter Lebensmittelkeime. Dabei rücken vor allem Milch und Fleisch als essenzielle Lebensmittel der westlichen Bevölkerung in den Fokus der Analysen.

Kuhmilch und deren Milchprodukte sind Quelle einer Vielzahl von möglicherweise pathogenen Mikroorganismen [17]. Meist gelangen dabei die Lebensmittelkeime durch den direkten Kontakt mit infizierten Quellen in der Farmumgebung oder durch Exkremente infizierter Tiere am Euter in die Milch. Meist sind die Lebensmittelerkrankungen mit dem Verzehr von Rohmilch oder -käse verbunden. Dennoch sind Fälle bekannt, bei denen der Konsum von pasteurisierten Milchprodukten Ursache für eine Erkrankung war. Dies ist darauf zurückzuführen, dass einige der Organismen selbst nach der Pasteurisierung noch aktiv sein können oder die Milchprodukte im Laufe des weiteren Prozessierens rekontaminiert werden [12, 17].

Auch durch den Verzehr von mikrobiell kontaminiertem Fleisch (-Produkten) kann eine Vielzahl von Krankheitserregern wie zuvor bereits beschrieben übertragen werden.

Besonders Geflügel, aber auch Schweine- oder Rindfleisch geraten im Zusammenhang mit Lebensmittelinfektionen immer wieder in den Fokus der Betrachtung. Dabei spielt vor allem die Aufnahme von halb garem oder rohem Fleisch eine entscheidende Rolle.

In den nachfolgenden Abschnitten werden einige wichtige Lebensmittelpathogene vorgestellt und verschiedene Identifizierungsverfahren diskutiert. Dabei wird, neben bekannten mikrobiologischen, biochemischen oder optischen Detektionsverfahren, die Raman-Spektroskopie, als alternative Analysetechnik, hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit geprüft. Im Anschluss werden die im Rahmen der vorliegenden Dissertation entstandenen Ergebnisse zusammengefasst. Die Arbeit schließt mit einem Resümee über das Potenzial der Raman-Mikrospektroskopie als diagnostisches Werkzeug im Lebensmittelsektor ab und zeigt in diesem Zusammenhang mögliche zukünftige Anwendungsfelder auf.



## 1.2 Ausgangssituation

Erkrankungen, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Verzehr von mikrobiell kontaminierten Lebensmitteln stehen, sind schon so alt wie Hippokrates selbst und sind unter dem Begriff Lebensmittelvergiftung zusammengefasst [18].

Bereits die „große Plage von Athen“ im fünften Jahrhundert v. Chr., welche zum Niederschlag der Athener im Peloponnesischen Krieg führte, könnte mutmaßlich durch mit Salmonellen verseuchtem Weizen verursacht worden sein [19].

Im Mittelalter wurden Lebensmittelerkrankungen allerdings dem Zorn Gottes oder anderen böartigen Mächten zugeschrieben [20]. Noch bis zum 19. Jahrhundert wurde angenommen, dass teuflische Hände im Spiel waren, wenn Menschen nach dem Verzehr von Lebensmitteln Symptome wie Halluzinationen, bizarres Verhalten und schmerzhaftes Muskelzucken aufzeigten. Heute weiß man, dass viele Epidemien zwischen dem neunten und 19. Jahrhundert, u. a. durch den Verzehr von mit *Claviceps* (parasitäre Pilze) verseuchtem Roggen ausgelöst wurden [21].

Der Verkauf von ranzigen, kontaminierten und verunreinigten Lebensmitteln war bis zur Einführung von Hygiene, Kühlung und Ungezieferkontrolle im 19. Jahrhundert alltäglich. Erst die Entdeckung von Techniken zur Abtötung von Keimen durch Hitze und andere mikrobiologische Studien, wie die von Wissenschaftlern wie *Louis Pasteur*, gaben den Anstoß für die Einführung von Hygienestandards, die bis zum heutigen Tag in den entwickelten Ländern aktuell sind. Weiterführende Arbeiten von *Justus von Liebig*, der moderne Lebensmittellager und Konservierungsmethoden entwickelt hatte, ist es zu verdanken, dass Lebensmittelerkrankungen eingeschränkt werden konnten.

In den vergangenen Jahren hat das bessere Verständnis für die Ursachen von Lebensmittelerkrankungen dazu geführt, dass Systeme wie das HACCP (engl.: *Hazard Analysis and Critical Control Points*; Gefahrenanalyse und kritische Kontrollpunkte) eingeführt wurden, die Risiken vorbeugend identifizieren und eliminieren können. Das HACCP-Konzept ist heute die EU-Richtlinie für Lebensmittel [5, 22]. Dennoch müssen jegliche Richtlinien auf die zur Diagnostik verwendeten Verfahren vertrauen.

Welche Mikroben im Zusammenhang mit Lebensmittelerkrankungen relevant sind und welche Analyseverfahren momentan zur Detektion angewandt werden, soll im nachfolgenden Kapitel erläutert werden.

### 1.2.1 Lebensmittelrelevante Mikroorganismen

Viele pathogene Lebensmittelkeime weisen ein ubiquitäres Vorkommen auf und werden im Allgemeinen aus Boden, Wasser, Tieren oder Pflanzen isoliert. Meist werden die Organismen erst durch das betriebliche Prozessieren auf das Rohmaterial übertragen. Dabei spielt die Einbringung der Erreger durch den Menschen eine genauso entscheidende Rolle, wie die verwendeten Arbeitsutensilien und mögliche Rekontaminationen nach dem eigentlichen Bearbeitungsprozess. Da die Erreger zudem über lange Perioden auf den Lebensmitteln, welche geeignete Nährstoffquellen bieten, überleben können, ist es von großem Interesse den Keimen entgegenzuwirken.

Nachfolgend wird auf einige relevante Lebensmittelkeime, die für den Verderb und für die Vergiftung von Fleisch, Milch und Milchprodukten verantwortlich sind, näher eingegangen.

#### ***Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis***

*Bacillus cereus* und *Bacillus anthracis* sind Spezies Gram-positiver, Endosporen bildender, beweglicher und aerob, aber auch fakultativ anaerob, wachsender Stäbchen.

*B. cereus* ist ein Bodensaprophyt, der sich leicht über viele verschiedene Lebensmittel, vor allem pflanzlichen Ursprungs, verteilt. Oft wird er auch aus Fleisch, Eiern und Milchprodukten isoliert. Eine Lebensmittelvergiftung mit *B. cereus* ist meist nur von kurzer Dauer, kann sich aber unterschiedlich symptomatisch äußern: Gelangen vegetativ wachsende Zellen in den Dünndarm werden Enterotoxine ausgeschüttet, die zu Diarrhöe führen (Diarrhöe-Typ), während bei direkter Freisetzung der Toxine im Lebensmittel Symptome wie Brechreiz auftreten (emetischer Typ) [23, 24]. Häufig werden diese Erscheinungen mit hitzebehandelten Lebensmitteln assoziiert. Der Diarrhöe-Typ ist oftmals mit der Essensaufnahme von kontaminierten Fleischprodukten, Gemüsen, Suppen, Soßen und Milchprodukten verbunden, während Lebensmittel wie Reis, Nudeln und Pasteten oft mit dem emetischen Typ in Verbindungen gebracht werden. [24-26]. Ursache sind hochresistente Endosporen und hitzestabile Peptide, die über den gesamten Herstellungsprozess aktiv bleiben. Deshalb sind die Erreger oft auch nach dem Kochen oder Kühlen überlebensfähig. Meist führt die Hitzebehandlung zur Sporenkeimung und aufgrund fehlender Konkurrenz können sich die, sonst nicht kompetitiven, Bazillen gut vermehren [23].

Dies gilt ebenfalls für den hochpathogenen Erreger *Bacillus anthracis*.

Obwohl überwiegend Lebensmittelinfektionen ausgelöst durch *Bacillus cereus* in Erscheinung treten, kann eine Infektion mit dem eher atypischen Lebensmittelkeim *Bacillus anthracis* nicht ausgeschlossen werden. Besonders durch das bekannte hohe Potenzial des Endosporen bildenden Keims im Einsatz als biologische Waffe ist stets das Risiko bioterroristischer Anschläge durch die willentliche Einbringung des Keims in Lebensmittel gegeben [14, 27].

Der Anthrax verursachende Keim ist ein Erreger animalischer Herkunft, der durch den direkten Kontakt mit infizierten Tieren oder deren Produkte auf den Menschen übertragbar ist. Dabei variiert das Krankheitsbild von Lungen-, über Haut- oder gastrointestinale Infektionen [28]. Die Mehrheit der Anthraxerkrankungen beim Menschen können auf agrokulturelle und industrielle Erzeugnisse zurückgeführt werden. Dabei gehen die Magen-Darm-Erkrankungen auf die Aufnahme von kontaminiertem Geflügel und Fleisch zurück. Statistisch gibt es weltweit jedes Jahr 2.000 bis 20.000 Fälle von Anthrax [29].

### ***Brucella* spp.**

Die Gram-negativen Brucellen sind Zoonoseerreger der Brucellose, welche in Ländern der Mittelmeerregion, im Mittleren Osten, der Mongolei und in Südamerika verbreitet sind [30]. Neben *Brucella melitensis* zählen auch *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis* und die marinen *Brucella*-Vertreter *B. pinnipedialis* und *B. canis* zu den Spezies, die für Menschen virulent und somit infektiös sind [31]. Das klinische Erscheinungsbild ist dabei durch undulierendes Fieber, Gelenkschmerzen, Abdominal- und Kopfschmerz, sowie Persönlichkeitsänderungen beschrieben [14, 32]. Oft wird Brucellose in Verbindung mit dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, Kontakt mit infizierten Tieren oder im Zusammenhang mit Laborunfällen erwähnt [31, 33, 34].

Durch die hohen hygienischen Standards und Sicherheitsmaßnahmen sollten kommerziell erhältliche Lebensmittel der westlichen Länder nicht von Brucellen betroffen sein. So wird z. B. in Deutschland Milch bei 72 bis 75 °C für 15 bis 30 s pasteurisiert, wodurch Brucellen abgetötet werden [31]. Dennoch sind auch heute noch *Brucella*-Ausbrüche in Europa zu verzeichnen. Diese sind erfahrungsgemäß eng mit dem Verzehr von Rohmilchprodukten verknüpft. In Spanien gab es z. B. in 2002 einen Ausbruch in Verbindung mit unpasteurisierten Rohmilch-Ziegenkäse [35]. Ebenso

wurden Brucellosefälle nach dem Verzehr von Rohmilchkäse 2008 in Griechenland wahrgenommen [36].

Im Vergleich zu den vereinzelt auftretenden Fällen in Europa verzeichnen Entwicklungsländer jährlich neue Brucellosefälle [37-39].

Eine weitere Gefahr geht von einer beabsichtigten Einbringung von Brucelloseerregern in Lebensmitteln aus. Die experimentelle Arbeit mit den hochpathogenen Erregern ist im Hinblick auf Biowaffen-Entwicklungsprogrammen geschichtlich belegbar [14, 15]. Auch wenn die Sterblichkeitsrate für Brucellose sehr gering ist, verbirgt sich dahinter eine kräftezehrende und langwierige Erkrankung, von der eine reale Bedrohung für das öffentliche Gesundheitssystem ausgeht. Insbesondere durch das geringe Auftreten von Brucellose-Fällen, sind Mediziner und Fachpersonal der westlichen Welt nur gering mit den klinischen und epidemiologischen Eigenschaften der Krankheit vertraut [40].

Zusätzlich wird das Kontaminationsrisiko mit *Brucella*-Spezies durch die Komplexität moderner Lebensmittelketten und dem Handel von Lebensmitteln über die ganze Welt zu einer realen Bedrohung und Herausforderung für die Aufrechterhaltung der Lebensmittelsicherheit.

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* sind Gram-negative, fakultativ anaerobe Bazillen, die im Allgemeinen im Darm von Menschen und Warmblütern vorkommen. Die kleinen Stäbchen sind mittlerweile als Modellorganismen für zahlreiche mikrobielle Analysen (z. B. bakterielle Physiologie, Metabolismus, Signaltransduktion, genetische Abläufe, Zellwandstruktur und Funktion) bekannt.

Während die meisten der bekannten *E. coli*-Stämme harmlos sind, können einige pathogene Stämme verschiedenartige Erkrankungen, wie Gastroenteritis, das hämolytisch urämische Syndrom (HUS), Harnwegsinfekte (engl.: *urinary tract infection*, UTI), Sepsis, Meningitis oder Lungenentzündung hervorrufen [26]. Ursachen für die Übertragung der Erreger auf den Menschen sind meist eng mit vernachlässigten Hygienevorschriften verbunden.

Besonders der enterohämorrhagische *Escherichia coli* hat in den letzten Jahren für Schlagzeilen gesorgt. Vorwiegend in Entwicklungsländern ist es vermehrt nach Aufnahme von kontaminierten Fleisch, Früchten und Obst zu Ausbrüchen mit diesem Erreger gekommen. Der als EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) bekannte Keim gilt

als Hauptauslöser für lebensmittelbedingte Erkrankungen. Das Gesundheitswesen stufte den Erreger 1982 in Folge einer EHEC-Epidemie in den USA als signifikanten Lebensmittelkeim ein [41]. Der bis heute wichtigste EHEC-Serotyp im Hinblick auf das öffentliche Risiko ist *E. coli* O157:H7, dessen Reservoir hauptsächlich Rinder sind. Doch auch Schafe, Ziegen, Wildtiere und andere Säuger (z. B. Schweine, Pferde, Hunde, Hasen und Katzen) können als Lebensraum für den Erreger infrage kommen [42].

Aber auch andere *Escherichia coli*, u. a. enterotoxigene *E. coli* (ETEC), enteropathogene *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) oder Shigatoxin bildende *E. coli* (STEC) treten hin und wieder in Erscheinung [26, 43].

*E. coli* wird primär durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel (z. B. rohes oder halb gares Hackfleisch, Rohmilch, rohes Gemüse oder Sprossen) auf den Menschen übertragen. Dabei treten vorwiegend Symptome wie Magenkrämpfe, blutiger Durchfall, Erbrechen und Fieber auf. Die Inkubationszeit des Erregers beträgt zwischen drei und acht Tagen. Während sich die meisten Patienten innerhalb von zehn Tagen wieder rehabilitieren, kann sich eine Erkrankung in Einzelfällen zu einer lebensbedrohlichen Infektion ausweiten. Dabei kann der Patient Symptome des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) aufzeigen.

Fäkal verunreinigtes Wasser oder Fleisch, aber auch Kreuzkontaminationen während des Herstellungsprozesses durch verunreinigtes Fleisch oder kontaminierte Küchen und Utensilien können Ursache für Infektionen sein.

Immer mehr Lebensmittel rücken durch vorangegangene Ausbrüche mit *E. coli* O157:H7 in den Fokus der Betrachtung. Es liegen bereits Vorfälle mit halb garen Hamburgern, luftgetrockneter Salami, unpasteurisierten Cider, Joghurt und Rohmilchkäse vor [42]. Auch durch den Kontakt mit Fäkalien von Haus- oder Wildtieren während des Reifungs- und Verarbeitungsprozesses ist eine ansteigende Zahl von *E. coli*-Fällen nach dem Konsum von Früchten und Gemüse zu verzeichnen [44].

### ***Listeria monocytogenes***

Der Lebensmittelkeim *L. monocytogenes* ist ein Gram-positives Stäbchen der Gattung *Listeria*, welcher eine hohe Anpassungsfähigkeit an seine Umgebung aufweist. Der Keim kann sowohl niedrige Temperaturen (2 - 4 °C), als auch einen niedrigen pH-Wert und osmotischen Stress, welcher durch z. B. hohe Salzkonzentrationen ausgelöst wird,

überleben [45]. Somit ist es dem pathogenen Erreger möglich, Konservierungsprozesse und Sicherheitsbarrieren bei der Lebensmittelherstellung zu überwinden, welches ihm zu einem potenziellen Risiko für die menschliche Gesundheit macht.

*L. monocytogenes* verursacht eine Listeriose, eine schwere Infektionskrankheit, die oftmals mit Klinikaufenthalten und zudem mit Todesfällen verbunden ist. Besonders Schwangere, Neugeborene, ältere und immungeschwächte Personen sind anfällig für diese Erkrankung [4]. Die lange Inkubationszeit der Listeriose erschwert dabei die Detektion des Erregers und so das Aufspüren der kontaminierten Nahrungsmittel [45].

*L. monocytogenes* kann in einer Vielzahl von rohen und verarbeiteten Lebensmitteln, wie in Milch und Milchprodukten, verschiedenen Fleischsorten und deren Produkten (Rind, Schwein oder fermentierte Würste), aber auch in frischen Produkten wie Rettich und Kohl oder in Meeresfrüchten und Fisch vorkommen.

### ***Pseudomonas* spp.**

Die Gattung *Pseudomonas* ist eine hochheterogene und ökologisch signifikante Gruppe von Bakterien. Die Gram-negativen, beweglichen und aeroben Stäbchen sind weit verbreitet und sind besonders durch ihre erhöhte metabolische Anpassungsfähigkeit aufgrund eines komplexen enzymatischen Systems charakterisiert [46, 47]. Pseudomonaden haben nur geringe Anforderungen an Nährstoffe, weshalb die Gattung in den verschiedensten Lebensräumen, wie z. B. im Boden oder Süß- und Salzwasser, zu finden sind. Doch auch auf klinischen Instrumenten, aseptischen Lösungen oder Kosmetikartikeln wurden die Keime bereits gefunden [48].

Einige der *Pseudomonas*-Spezies erscheinen opportunistisch pathogen für Menschen und Tiere, während andere wiederum schädlich für Pflanzen sind [47, 49].

Als opportunistisch humanpathogener Keim der Gattung *Pseudomonas*, der durch Lebensmittel und Wasser übertragen werden kann, ist *Pseudomonas aeruginosa* bekannt. Vor allem immungeschwächte Personen und Personen mit zystischer Fibrose können leicht mit diesem Erreger infiziert werden. Um Infektionen vorzubeugen, gibt es in einigen Ländern die Bestimmung, dass abgefülltes Trinkwasser frei von *P. aeruginosa* sein muss [50].

Die meisten Vertreter der *Pseudomonas*-Spezies sind allerdings psychotrop und als Hauptverantwortliche für den Lebensmittelverderb bekannt. Dabei zählt neben *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. fragi* zu den Spezies, die bisher am häufigsten aus

Lebensmitteln isoliert wurden [51, 52]. Oft spielen die Keime beim Verderb von Gemüse eine entscheidende Rolle, da sie sich während der Lagerung und selbst während der Verarbeitung ständig weiter vermehren können. Aufgrund ihrer hohen enzymatischen Aktivität bewirken sie dabei z. B. die Verfärbung der befallenen Gemüsesorten [48, 53, 54].

Auch Fischprodukte, besonders jene, die unter aeroben und eisgekühlten Bedingungen gelagert werden, bieten eine optimale Lebensgrundlage für die *Pseudomonaden*, die bei niedrigen Temperaturen lebensfähig sind. Dabei produzieren sie flüchtige Komponenten, wie Aldehyde, Ketone oder Ester, die den Geschmack beeinflussen [55, 56].

Des Weiteren haben *Pseudomonas*-Spezies einen entscheidenden Einfluss auf den Milchverderb. Während der Lagerung von Rohmilch bilden sie thermotolerante, lipolytische und proteolytische Enzyme, die während der Pasteurisierung und der UHT-Behandlung stabil bleiben [57]. Das hat nicht nur eine Minderung der Qualität, sondern auch der Mindesthaltbarkeit zur Folge [46, 58]. Doch auch Kontaminationen der Erreger nach der Pasteurisierung haben einen hohen Anteil an dem Verderb konventionell pasteurisierter Milch während einer gekühlten Lagerung [58].

### ***Salmonella* spp.**

Die Gram-negativen Salmonellen sind vermeintlich die bekanntesten Vertreter der pathogenen Lebensmittelkeime [59]. Noch heute ist mit *Salmonella*-Infektionen, nicht nur in Entwicklungs-, sondern auch in Industrieländern, eine hohe Sterblichkeitsrate assoziiert [26, 60]. Dabei sind 95 % aller Salmonellosen bedingt durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel [4]. Obwohl Salmonellen häufig in einem Kontext mit landwirtschaftlichen Produkten gebracht werden, können sie eine breite Masse an Wirten bevölkern.

Rohes Fleisch, Geflügel, Ei, Milch und deren Produkte gelten als vielfache Auslöser von Salmonellen bedingten Lebensmittelvergiftungen. [17, 59, 61, 62]. Doch auch viele andere mit den Erregern verseuchte Lebensmittel, wie Mayonnaise [62], Salat, Eiscreme [63] oder Orangensaft [64] waren bisher schon Ursache für Erkrankungen. Dabei werden die Lebensmittel vorwiegend durch Kontakt mit anderen infizierten Lebensmitteln oder unzureichend gereinigten Utensilien oder Händen kontaminiert.

Eine Salmonellose ist charakterisiert durch Fieber, abdominale Schmerzen, Übelkeit, Diarrhöe und teilweise Erbrechen [63], wobei die Symptome meist auf wenige Tage begrenzt sind. Nur in wenigen Fällen, meist im Zusammenhang mit Immungeschwächten, schwangeren oder älteren Menschen, kann es zu ernsthaften Komplikationen kommen [65]. Da die Inkubationszeit für *Salmonella*-Infektionen zwischen 8 und 72 h schwankt, gestaltet sich die Ermittlung des krankheitsverursachenden Lebensmittels jedoch oftmals sehr schwierig.

### ***Staphylococcus aureus***

Die Gram-positiven, fakultativ anaeroben Kokken *Staphylococcus aureus* sind ebenfalls bekannte Verursacher von Lebensmittelerkrankungen, welche im Zusammenhang mit Fleisch, Geflügel, Ei- oder Milchprodukten stehen. Meist werden dabei die Nahrungsmittel während des Präparations- und Herstellungsprozesses mit dem Erreger kontaminiert, wobei der eigentliche Lebensraum der Keime Nase, Haut oder Haare von Warmblütern sind [66]. Tatsächlich sind 30 % bis 50 % der menschlichen Bevölkerung Träger von *Staphylococcus aureus* [66]. Obwohl Kontaminationen von Lebensmitteln zumeist mit einer unzureichenden Handhabung und falschen Lagerbedingungen einhergehen, können *Staphylococcus aureus* auch in Milch von Nutztieren (z. B. Milchkühe, Schafe oder Ziegen), die eine subklinische Mastitis aufweisen, vorkommen [67].

Zusätzlich zu ihrer ökologischen Nische erklärt deren Anpassungsfähigkeit an verschiedenste Temperatur- und pH-Bereiche sowie Natriumchlorid-Konzentrationen deren Vorkommen in einer Vielzahl von Lebensmitteln [66].

Im menschlichen Körper können die pathogenen Staphylokokken beinahe jedes Gewebe befallen und somit Infektionen, wie Lungenentzündung oder Abszesse, aber auch systemische Erkrankungen, wie Sepsis oder das toxische Schocksyndrom auslösen [68].

### ***Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* sind Gram-negative Zoonoseerreger, welche zu einer akuten Gastroenteritis oder teilweise zu schwerwiegenderen Krankheiten führen können. Durch die Fähigkeit bei Tiefkühltemperaturen vermehrungsfähig zu bleiben, stellen die Keime ein Risiko für die Lebensmittelsicherheit dar und werden in einigen Ländern sogar den Salmonellen als wichtigste Lebensmittelpathogene gleichgestellt [10]. Der



symptomatische Verlauf einer Infektion mit *Y. enterocolitica* gestaltet sich dabei oft abhängig vom Alter der betroffenen Personen. So sind z. B. viele Fälle von infizierten Kindern unter 5 Jahren verzeichnet [10]. Der Krankheitserreger führt vermehrt zu Fieber, starken Bauchschmerzen, blutigem Durchfall, aber auch Blinddarm-entzündungen [69]. In wenigen Fällen können Arthritisbeschwerden nach einer Infektion auftreten.

Die als signifikante Lebensmittelkeime eingeordneten *Y. enterocolitica* werden jedoch relativ selten aus Nahrungsmitteln isoliert [10]. Bisher wurden pathogene Erreger vorwiegend aus Schweinen isoliert [69], obwohl einige andere Haustiere wie Hunde, Katzen oder Schafe, aber auch Wildtiere wie Mäuse, Rotwild oder Füchse als potenzielle Wirte infrage kommen [10, 70]. Dennoch müssen auch Gemüse und unbehandeltes Wasser als Infektionsquelle für eine Yersiniose angesehen werden.

Der häufigste Übertragungsweg ist dabei die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln, die mit Ausscheidungen infizierter Lebewesen in Kontakt gekommen sind. Eine zwischenmenschliche Übertragung der Erreger ist dagegen selten.

*Y. enterocolitica* bildet eine biochemisch heterogene Gruppe, die mehr als 50 verschiedene Serotypen umfasst, von denen nur wenige tatsächlich pathogen sind. In den USA ist der Serotyp O:8 der häufigste Auslöser für Infektionen, gefolgt von O:3, O:5,27, O:9, etc. [71]. In Europa, wie in China, tritt dagegen vor allem der Serotyp O:3 in Erscheinung [72].

### **1.2.2 Analyseverfahren zur Detektion von Keimen in Lebensmitteln**

Das Hygienerecht der Europäischen Union verlangt die Kontrolle mikrobiologischer Kriterien während der gesamten Prozesskette der Lebensmittelherstellung. Die bisher etablierten klassischen mikrobiologischen Kultivierungsverfahren sind hierfür jedoch nur bedingt geeignet. Deswegen wurden diese in den letzten Jahrzehnten durch eine Vielzahl anderer Methoden ergänzt.

Im Hinblick auf die Lebensmitteldiagnostik wurden vor allem die zuvor beschriebenen pathogenen Erreger mit DNA-basierten Techniken [27, 73-79], immunologischen Verfahren [80-82], Biosensoren [2, 83], Massenspektrometrie [84-88] oder Infrarot-Spektroskopie [89-93] analysiert.

Im folgenden Abschnitt sollen diese Verfahren vorgestellt und hinsichtlich ihrer Vor- und Nachteile untersucht werden, um deren Leistungsfähigkeit im Hinblick auf Vor-Ort-Analysen in der Analytik von Nahrungsmitteln zu evaluieren. Dabei ist die Beurteilung der Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität genauso entscheidend, wie die Möglichkeit Multiplexanalysen durchzuführen, die eine gleichzeitige Charakterisierung und Identifizierung mehrerer Pathogene erlauben. In den meisten Fällen bedeutet diese Option eine Zeit- und Kostenersparnis.

#### **Charakterisierung von Bakterien durch Kultivierung**

Die konventionellen mikrobiologischen Testverfahren basieren auf der Kultivierung von vitalen Erregern auf spezifischen Medien, um so die Keime aus der Lebensmittelmatrix zu isolieren. Diese Methodik ist sehr sensitiv, preiswert und liefert qualitative sowie quantitative Informationen über die Anzahl und die Natur der Organismen in Lebensmitteln. Dennoch ist dieses traditionelle Verfahren sehr aufwendig und gliedert sich in folgende Basisschritte: (1) Vorkultivierung, (2) selektive Anreicherung und letztlich (3) biochemisches Screening und serologische Überprüfungsverfahren [16]. Demnach ist mit dieser Methodik ein hoher Zeitaufwand von meist mehreren Tagen verbunden, bevor eine eindeutige Identifizierung der Bakterien erfolgen kann. Zudem ist es ein sehr laborintensives Verfahren, welches neben der Medienpräparation, die Inokulation der Platten bedingt, wodurch Fachpersonal unersetzlich wird [94]. Außerdem können nur dann Bakterien detektiert werden, wenn sie tatsächlich kultivierbar sind. Es ist jedoch bekannt, dass einige Keime, darunter einige pathogene Vertreter,

die Fähigkeit besitzen, einen VBNC-Zustand (engl.: *viable but not culturable*) einzunehmen. In diesem Stadium sind sie zwar aktiv, aber nicht länger kultivierbar [95].

Somit lässt sich schlussfolgern, dass obwohl das Kultivierungsverfahren noch immer als goldener Standard angesehen wird, jede weitere Technik, welche eine schnellere Analyse und die Erfassung aller Kontaminationen erlaubt, eine vielversprechende Ergänzung ist.

### **DNA-basierte Methoden**

Unter dem Begriff DNA-basierte Methoden kann man sowohl die Analysemethode Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) als auch die Technologie der DNA-Microarrays zusammenfassen.

Bei einer PCR werden isolierte DNA-Stränge zunächst mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidprimern vermehrt, um im weiteren Verlauf die gewonnenen PCR-Produkte elektrophoretisch aufzuspalten und die resultierenden DNA-Muster durch Abgleich mit genetischen Datenbanken zu analysieren. Bei einem DNA-Mikroarray wird der Vorgang der PCR um verschiedenste Hybridisierungsreaktionen erweitert, um so mehrere Tausend Gene gleichzeitig zu detektieren.

Beide Methoden haben im letzten Jahrzehnt die Lebensmittelkeimdetektion signifikant verbessert. Durch die Weiterentwicklung der Methoden zu Multiplexarrays [73, 76, 77, 79] liefern sie nun schnell Ergebnisse mit hoher Spezifität und im Vergleich zu Kulturbasierten Methoden mit steigender Sensitivität, wobei bis zu 100 CFU g<sup>-1</sup> (engl.: *colony forming units per gram*, koloniebildende Einheiten pro Gramm) detektierbar sind [16].

Obwohl die Methoden mittlerweile nach 24 bis 30 Stunden Ergebnisse liefern, ist eine Vorkultivierung der Erreger stets erforderlich. Zudem bleibt die Isolierung der Erreger-DNA aus den meist komplexen Matrices problematisch, da z. B. Probenbestandteile PCR spezifische Enzyme inhibieren können [96]. Eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen kann erst nach Zugabe entsprechender Marker realisiert werden [78]. Diese Faktoren verursachen einen hohen Labor- und Kostenaufwand, was Vor-Ort-Analysen momentan undenkbar macht.

### **Immunologische Verfahren**

Immunologische Verfahren vertrauen auf die spezifische Affinität von gezielt eingesetzten Antikörpern zur Detektion einzelner Bakterienspezies. Dieses Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, auch im Hinblick auf komplexe Matrices, aus. Um die Spezifität weiter zu erhöhen, werden vermehrt rekombinante Antikörper hergestellt [97]. Sowohl polyklonale, als auch monoklonale Antikörper werden bereits für die Detektion von Lebensmittelkeimen eingesetzt [80].

Eine bereits etablierte Anwendung immunologischer Verfahren im Rahmen der Lebensmittelsicherheitsbewertung ist ELISA (engl.: *enzyme linked immunosorbent assay*) [98]. Dabei werden in einem sogenannten Sandwichverfahren die Zielanalyte (mikrobielle Zellen mit Oberflächenantigenen oder Antigene in bakteriellen Lysaten) von einem immobilisierten Antikörper gefangen und im weiteren Verlauf mithilfe eines weiteren Antikörpers detektiert. Größte Einschränkung dieses Verfahrens ist das hohe Detektionslimit, welches bei einer Nachweisgrenze von  $10^4$  bis  $10^6$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter liegt [16].

Obwohl auch einige andere immunologische Analyseverfahren das Potenzial aufzeigen in eine Prozesskette eingebunden zu werden, werden ohne vorherige Anreicherungsschritte nur geringe Sensitivitäten erzielt. Dabei ist sowohl die Spezifität als auch die Sensitivität vor allem von der Qualität der Antikörper abhängig. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass bei Konformationsänderungen der Zielantigene durch z. B. fehlerhafte Expression oder Denaturierung, die Bindungsaffinität reduziert werden kann. Eine Lebend-Tod-Unterscheidung ist nicht möglich [16]. Zudem ist ELISA im Hinblick auf Multiplexanalysen immer noch Zeit-, Kosten- und Labor-intensiv [98].

### **Biosensoren**

Biosensoren sind analytische Geräte, die eine biologische Antwort in u. a. elektrische Signale umwandeln können. Dabei wird ein biospezifisches Erkennungselement, oftmals ein Antikörper oder Nukleinsäure-Proben, in einem Transduktor integriert, welcher die Impulse z. B. in optische oder elektrochemische Signale umwandelt.

In dem aufsteigenden Feld der Biosensorik weisen vor allem elektrochemische Biosensoren das Potenzial für die Detektion von Lebensmittelkeimen auf. Sie zeichnen sich im Allgemeinen durch Schnelligkeit, geringe Kosten und Miniaturisierung aus [2]. Doch deren limitierte Sensitivität und die Einschränkung von Multiplexanalysen

durch technische Schwierigkeiten bei dem Auslesen von Multielektroden Arrays haben bisher dazu geführt, dass nur wenige Studien mit Realproben durchgeführt werden konnten [16, 94].

Optische Biosensoren werden dagegen durch eine hohe Sensitivität und die Möglichkeit zu Multiplexuntersuchungen charakterisiert, verursachen aber durch komplexe Instrumente insbesondere bei markerfreien Analysen hohe Kosten und können nur begrenzt verkleinert werden [83].

### **Massenspektrometrie**

Massenspektrometrie (MS) bezeichnet ein Verfahren, mit welchem man das Masse-Ladungs-Verhältnis einzelner Atome oder Moleküle nach deren Ionisierung bestimmen kann. Durch den Einsatz von sanften Ionisierungstechnologien ist es möglich geworden, Proteinanalysen durchzuführen und somit auch Kulturkeime zu analysieren. Dabei wird vorwiegend zur Bakteriendetektion das Prinzip der MALDI/TOF-MS (engl.: *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) angewandt, welches einen fingerabdruck-ähnlichen Abgleich der vorliegenden Zellen mit einer entsprechenden Datenbank erlaubt. Ein entscheidender Vorteil der Methodik ist die Möglichkeit auf bereits existierende Datenbanken zurückzugreifen, welche durch das beständige Wachstum proteomischer Bibliotheken stetig ergänzt werden kann [99].

Die schnelle Methode ermöglicht zudem die Analyse ganzer Zellen ohne vorherigen Aufschluss der Proteine, Verdauungsprozesse, Einsatz von Biomarkern, Auftrennung oder anderen Waschschritten. Dabei können Mikroben mit Zelldichten von  $\leq 10^4$  Zellen detektiert werden [99]. Dennoch kann es durch Probe-Matrix-Interferenzen zu abweichenden oder fehlerhaften Ionisierungserscheinungen kommen. Auch durch die oft sehr teuren Komponenten und das fehlende Potenzial für Vor-Ort-Analysen findet die Methode wenig Anwendbarkeit in der Lebensmittelindustrie.

### **Infrarot-Spektroskopie**

Infrarot-Spektroskopie (IR) ist ein zerstörungsfreies, schwingungsspektroskopisches Verfahren basierend auf der Anregung von Molekülen in verschiedene Schwingungszustände mittels infraroter Strahlung.

Die dabei am häufigsten genutzte IR-Technik ist die FT-IR-Spektroskopie (Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie). Bereits existierende automatisierte Plattformen ermöglichen den Einsatz dieser Technik für Screeningverfahren im großen Maßstab.

FT-IR-Spektroskopie liefert Informationen über die biochemische Zusammensetzung von Zellen, weshalb zahlreiche Lebensmittelkeime mit diesem Verfahren bereits untersucht wurden [100]. Durch eine anschließende Auswertung unter Ausnutzung mathematischer Algorithmen (Chemometrik) kann ein hohes Diskriminierungspotenzial von Mikroben verschiedener Ebene erzielt werden [101].

Dennoch erfordert das Verfahren eine vorgelagerte Anreicherung der Zellen, um sowohl eine ausreichende Biomasse zu erzeugen, als auch die Bakterien in eine reine Umgebung zu bringen [16].

Trotz dieser zahlreichen Anwendungen, welche sich bereits positiv auf die Keimdetektion ausgewirkt haben, gibt es stets Nachteile. Besonders die Weiterentwicklung der Methoden für schnelle und preiswerte Vor-Ort-Analysen ohne Vorkultivierung steht noch aus. Deshalb soll nachfolgend geprüft werden, welches Potenzial eine Anwendung der Raman-Spektroskopie zur Keimdeteektion im Bereich der Lebensmitteldiagnostik hat.

## 1.3 Stand der Forschung: Raman-Spektroskopie als alternative Detektionsmethode

Die Raman-Spektroskopie ist, wie die Infrarot-Spektroskopie, eine schwingungsspektroskopische Technik, welche auf der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen beruht. Während der überwiegende Teil des zurückgeworfenen Lichts, die selbe Wellenlänge besitzt wie das eingestrahlte Licht (Rayleigh-Streuung), bedeutet inelastisch gestreut, dass das Streulicht eine andere Wellenlänge als das Einfallende aufzeigt. Die dabei entstehenden Frequenzunterschiede lassen sich detektieren und sind nachfolgend charakteristisch für das untersuchte Material. Dieser Effekt wird als Raman-Effekt bezeichnet und wurde erstmals von den beiden indischen Wissenschaftlern *C. V. Raman* und *K. S. Krishnan* beobachtet [102-104].

Die Raman-Spektroskopie besticht durch ihr Potenzial schnell, hochspezifisch und nicht invasiv Informationen von Biomolekülen zu liefern. Auch der minimale Probenpräparationsaufwand und das Arbeiten ohne zusätzliche Marker erhöhen im Vergleich zu anderen Techniken die Anwendbarkeit der Raman-Spektroskopie bei der Lebensmittelüberwachung. Zudem ist das Arbeiten unter physiologischen Bedingungen möglich, wodurch *In-vivo*- und *In-situ*-Analysen von zellulären Zielstrukturen und Biomolekülen unproblematisch sind [105, 106]. Dieser Punkt hebt einen entscheidenden Vorteil gegenüber der IR-Spektroskopie hervor, bei der wässrige Lösungen zu einem hohen und oft störenden Absorptionsuntergrund führen.

Nach Bestrahlung einer Probe mit monochromatischem Licht wird das inelastische Streulicht gesammelt und mithilfe eines Gitters am Detektor in die einzelnen Wellenzahlen aufgeschlüsselt, die wiederum in Summe ein Raman-Spektrum bilden. Das Raman-Spektrum einer komplexen Probe ist eine Kombination aller angeregten Molekülschwingungen. Somit kann man anhand der Signalbanden, Rückschlüsse auf die biochemische Zusammensetzung und molekulare Struktur der Probe ziehen.

Im Hinblick auf die Detektion von mikrobiellen Zellen ist das Raman-Spektrum ein komplexes spektroskopisches Signal, welches spezifische Informationen über Proteine, DNA, RNA, Kohlenhydrate und Lipide widerspiegelt [107]. Wie bereits zuvor angedeutet, trägt das in allen Bakterien vorhandene Wasser aufgrund seines geringen Raman-Streuquerschnitts kaum zum Raman-Spektrum bei.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde vermehrt versucht, zahlreiche biologische Fragestellungen mithilfe der Raman-Spektroskopie zu beantworten [106, 108].

Da der Raman-Prozess jedoch eine geringe Streueffizienz aufweist [109], nur jedes  $10^7$  Photon wird inelastisch gestreut [110], und bei Anregung von biologischen Materialien im sichtbaren Wellenlängenbereich zudem störende Fluoreszenz auftreten kann, wurden Raman-basierte Methoden entwickelt, die den bekannten Problemen entgegenwirken. Sowohl die Resonanz-Raman-Spektroskopie als auch die Oberflächen verstärkte Raman-Spektroskopie (engl.: *surface enhanced Raman spectroscopy*, SERS) sind Techniken, die eine Verstärkung des Raman-Effekts gewährleisten können. Dadurch kann mitunter eine Erhöhung der Sensitivität einhergehen. Die Anwendung der Raman-Mikrospektroskopie erlaubt jedoch die Analyse einzelner Zellen und Strukturen.

### **Resonanz-Raman-Spektroskopie**

Bei der Resonanz-Raman-Spektroskopie werden Moleküle mit einer Wellenlänge, die im Bereich der elektronischen Absorptionsbande liegt, angeregt. Durch die, am elektronischen Übergang, resultierenden gekoppelten Schwingungen wird eine Intensitätserhöhung bis zu einem Faktor von  $10^6$  erzielt [106]. Somit ist durch die Auswahl geeigneter Anregungswellenlängen eine selektive Molekülanregung möglich. Werden z. B. Bakterien mit ultravioletter (UV) Licht angeregt, kann man eine Verstärkung der Signale von Nukleinsäurebasen und aromatische Aminosäuren in Proteinen beobachten [111]. Bei sichtbarer Anregung von Bakterienzellen werden dagegen insbesondere Carotinoide oder Hämoproteine, wie Zytochrome, verstärkt [112, 113]. Zudem erlaubt die Resonanz-Raman-Spektroskopie bei Anregung im tiefen UV ( $< 250$  nm) die Detektion von fluoreszenzfreien Raman-Signalen, da bei niedrigeren Wellenlängen eine Fluoreszenzemission erst in sichtbaren Wellenlängenbereichen zu erwarten ist [114, 115]. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass eine selektive Anregung absorbierender Chromophore nicht nur zu deren Identifizierung, sondern auch als Markerbanden für die Diskriminierung von Zellen und Zellstrukturen eingesetzt werden kann [116-118].

Vor allem Bazillen und deren Endosporen, Pseudomonaden und Milchsäurebakterien wurden mithilfe der Resonanz verstärkten Methode analysiert [119-121].

Obwohl sich die Resonanz-Raman-Spektroskopie demnach für bakterielle Analysen eignet, erfordert eine Analyse noch immer eine Bakterienmasse von mindestens 100 bis



1000 Zellen, wobei Anwendungen mit meist deutlich höheren Zelldichten ( $\sim 10^6$  Zellen) realisiert werden [122]. Besonders dieses Kriterium behindert die Anwendung der Methode im Hinblick auf schnelle Analysen im Rahmen einer Lebensmitteldiagnostik.

### **Oberflächen verstärkte Raman-Spektroskopie (SERS)**

Bei SERS wird die Verstärkung des eingestrahnten Feldes an nanostrukturierten Metalloberflächen ausgenutzt. Dabei können zwei verschiedene Verstärkungsmechanismen beobachtet werden: eine elektromagnetische und eine chemische Verstärkung.

Während bei der elektromagnetischen Verstärkung Oberflächenplasmonen mit dem externen Feld koppeln und so ein verstärktes, evaneszentes Feld generieren, welches an dem Analytmolekül nahe den metallischen Nanostrukturen gestreut wird, beschreibt die chemische Verstärkung eine Komplex bildende Wechselwirkung des Analyten mit der metallischen Oberfläche. Meist werden Metalle wie Silber, Kupfer oder Gold in Form von Kolloiden oder strukturierten Oberflächen als SERS-aktive Substrate eingesetzt. Je nach Anwendung kann mit SERS eine  $10^4$  bis  $10^{15}$ -fache Verstärkung im Vergleich zur konventionellen Raman-Spektroskopie erzielt werden [123].

Natürlich ist die Anwendbarkeit des Verstärkungseffekts, im Rahmen einer gezielten und schnellen Keimdetektion, Thema zahlreicher wissenschaftlicher Arbeiten [123-126]. Die Problematik, die in diesem Zusammenhang immer wieder in Erscheinung tritt, ist durch die Vielfältigkeit der Herstellungsprozesse für SERS-Substrate gegeben, für die es bisher noch keine Standardisierung gibt [127]. Die Anfertigung identischer metallischer Nanostrukturen ist jedoch zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit von SERS-Spektren unumgänglich. Des Weiteren ist zu beachten, dass sich die spektrale Erscheinung von den konventionellen Raman-Spektren unterscheiden kann, da lediglich die Moden, die senkrecht zur Metalloberfläche ihre Polarisierbarkeit ändern, eine Verstärkung erfahren.

Dennoch konnten durch präzise Probenpräparationen und die Analyse in einem mikrofluidischen „Lab-on-the-chip“-System reproduzierbare mikrobielle SERS-Spektren generiert werden. Neun verschiedene *E. coli*-Stämme wurden in diesem Zusammenhang mit einer Genauigkeit von 92 % differenziert [128]. Andere lebensmittelrelevante Keime, wie *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* und *Enterococcus faecalis*, konnten ebenfalls mit SERS differenziert werden. Jedoch bedingt dieses Verfahren für eine Detektion wiederum eine hohe Zell-

dichte [129]. Auch die Detektion von *Bacillus*-Endosporen und damit verbunden die Analyse des sporenintrinsic Calcium-Dipicolinats (CaDPA) sind in zahlreichen SERS-Studien erfolgreich untersucht worden [130]. Dennoch konnte eine Differenzierung von pathogenen und nicht pathogenen Sporen bisher nicht hinreichend gegeben werden. Auch die Detektion von Bakterien und Endosporen aus Realproben und insbesondere aus Lebensmitteln steht noch aus.

### **Raman-Mikrospektroskopie**

Neben den signalverstärkenden Methoden hat sich die Raman-Mikrospektroskopie zur Identifizierung von mikrobiologischen Erregern durchgesetzt: Hierbei wird ein Raman-Spektrometer mit einem optischen, oft konfokalen, Mikroskop geeigneter Ausstattung (Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur und hoher Vergrößerung) kombiniert, um die räumliche Auflösung zu erhöhen. Mit einer Anregungswellenlänge im sichtbaren Bereich (532 nm) kann eine Analyse von einem Probenvolumen  $\leq 1 \mu\text{m}^3$  realisiert werden, wodurch das Raman-Spektrum eines einzelnen Bakteriums - ähnlich eines Fingerabdrucks - erfasst werden kann [131]. Hierin zeigt sich der Vorteil im Vergleich zu den signalverstärkenden Techniken: Aufwendige Vorkultivierungsverfahren werden durch die Analyse von einzelnen Bakterien abundant, was wiederum eine hohe Kosten- und Zeitersparnis mit sich führt.

Um jedoch einzelne Zellen anhand ihres spezifischen Raman-Signals zu identifizieren, ist der Aufbau einer Referenzdatenbank unerlässlich. Variationen zwischen den Einzelzellen müssen als gegeben angesehen werden und können somit nicht während der Messungen standardisiert werden. Der Einfluss von Kultivierungsparametern, wie Alter, Medium oder Temperatur auf die Entwicklung der Bakterien und somit auf das Spektrum muss zudem stets berücksichtigt werden [117, 132-134]. In diesem Kontext wurde die Zugabe von Mangan zum Kultivierungsmedium als Sporulationsbeschleuniger untersucht. Dabei wurden *Bacillus*-Sporen ohne und nach Zugabe von Mangan zum Medium kultiviert und Raman-spektroskopisch untersucht. Als Resultat dieser Studie ging hervor, dass Spektren von Endosporen, welche auf dem spezifischen Sporenmedium gewachsen sind, charakteristische Banden und Bandenverschiebungen aufwiesen [135].

Meist ist aber die komplexe Matrix, welche den Keim umgibt, von genauso großem Interesse wie die Wachstumsparameter selbst. So ist auch die Nutzung von

Fluoreszenzmarkern zur Lokalisierung der Keime in Kombination mit Raman-Mikrospektroskopie untersucht wurden [136, 137].

Die Einsatzfähigkeit der Raman-Spektroskopie zur Einzelzelldiagnostik in Realproben zeigt sich in der Studie von Harz et al., in der Keime der Spezies *N. meningitidis* in Zerebrospinalflüssigkeit detektiert wurden [138].

Das Potenzial der Raman-Mikrospektroskopie hinsichtlich der Detektion von Keimen in Lebensmitteln soll im Rahmen dieser Arbeit erfasst werden.

### **Raman-kompatible Inaktivierungsverfahren**

Beim Umgang mit mikrobiell kontaminierten und möglicherweise pathogenen Proben ist eine verlässliche und akkurate mikrobielle Inaktivierungsmethode unerlässlich. Im Hinblick auf Vor-Ort-Analysen ist zudem eine methodenkompatible Inaktivierung vor der eigentlichen Analyse wünschenswert, um ein gesichertes und risikominimiertes Arbeitsumfeld zu schaffen. Im Hinblick auf Raman-mikrospektroskopische Untersuchungen bedeutet dies, dass die Zellintegrität der abgetöteten Mikroben erhalten bleiben muss, da die Komposition der Zelle als Ganzes in einen spektroskopischen Fingerabdruck erfasst werden soll, um nachfolgend den Abgleich der Spektren mit Referenzdaten zu ermöglichen.

Hinzu kommt, dass sich eine Inaktivierung von *Bacillus*-Sporen herausfordernd gestaltet, da die Endosporen u. a. aufgrund ihres geringen Wassergehalts hochresistent gegen Hitze, physikalische oder chemische Einwirkung sind [139, 140].

Nach der Überprüfung von verschiedenen Inaktivierungsverfahren mit Danchlorix, Peressigsäure, einer Wofasteril-Alcapur-Mischung, Formaldehyd und Autoklavieren hat sich herausgestellt, dass eine Inaktivierung von Bakterien und im Speziellen von Endosporen mit einer 10 %igen Formaldehydlösung über einen Zeitraum von einer Stunde hinreichend ist, um anschließende Raman-spektroskopische Untersuchungen zu gewährleisten [141]. Dieses Verfahren wurde auf die in dieser Arbeit untersuchten Pathogene überführt.

### **Chemometrische Datenauswertung**

Wie sich bereits zuvor herauskristallisiert hat, sollte es möglich sein, einzelne Mikroben unterschiedlicher Taxonomie und somit unterschiedlicher biochemischer Zusammensetzung anhand ihres spezifischen Raman-Signals zu differenzieren [107].

Um jedoch die geringen Unterschiede bakterieller Raman-Signaturen zu visualisieren und die meist multidimensionalen Datenmengen auszuwerten, ist die Anwendung multivariater statistischer Datenanalysen unabdingbar. In diesem Zusammenhang haben sich unüberwachte Methoden, wie die hierarchische Clusteranalyse (HCA) oder *Principal Component Analysis* (PCA), genauso wie überwachte Lernalgorithmen, z. B. lineare Diskriminanzanalyse (LDA), *Support Vector Machines* (SVM) oder künstliche neuronale Netze (ANN), bewährt. Die Nutzung statistischer Auswertalgorithmen vertraut dabei auf große Datensätze, deren Spektren unter den gleichen Bedingungen aufgenommen und vorbehandelt wurden. Dies dient vor allem der Minimierung von externen Einflüssen, wie Herkunft, Kultivierung oder Alter der Mikroorganismen, aber auch von intrinsischen, gerätespezifischen Parametern, wie fluktuierende Laserintensität oder unterschiedliche Labortemperaturen, da diese unerwünschte Effekte auf die spektroskopischen Daten haben können [132, 135, 142].

Der Vorteil überwachter gegenüber unüberwachter Methoden besteht vor allem darin, dass Datenbanken trainiert (Klassifikationsmodell) und im Anschluss mithilfe eines Identifizierungsmodells validiert werden können.

Dieser Ansatz für die statistische Auswertung wurde auf die in der Arbeit generierten Daten überführt und mithilfe der Programmiersprache „Gnu“ R realisiert [143]. Die überwachten Methoden LDA und SVM wurden zum Aufbau von Klassifizierungsmodellen und zur anschließenden Validierung verwendet. Der Einsatz von PCA erfolgte im Sinne einer Dimensionsreduzierung, während hierarchische Clusteranalysen für die Einschätzung taxonomischer Einordnungen genutzt wurden. Im Vorfeld wurden die Raman-Spektren stets nach demselben Prinzip vorbehandelt: Zunächst wurde der Untergrund korrigiert und kosmische Spikes entfernt, bevor eine Wellenzahlkalibrierung mittels eines Standards (4-Acetamidophenol) durchgeführt wurde. Im weiteren Verlauf wurden die Spektren auf die signifikanten Bereiche begrenzt und Vektor-normiert [SM1, SM2, SM3, SM4].

## 1.4 Eigene Forschungsergebnisse

Obwohl bereits vielfältig biologische und medizinische Fragestellungen mittels Raman-Spektroskopie untersucht wurden, ist die Keimdetektion von Realproben im Hinblick auf eine schnelle Lebensmittelanalyse noch unterrepräsentiert.

Deshalb wurden im Rahmen dieser Dissertation bekannte nahrungsmittelassoziierte Pathogene mit Raman-Mikrospektroskopie untersucht:

Zur Detektion von *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* und anderen nah verwandten Endosporen wurde eine Datenbank aufgebaut, die es ermöglicht, die kleinen, hoch-resistenten Zellen in einem realen Umfeld zu detektieren [SM1].

Ein weiterer Aspekt der Arbeit bestand in der Evaluierung von Extraktionsmethoden zur Isolierung von Keimen aus Milch hinsichtlich ihrer Eignung im Kontext mit Raman-spektroskopischen Untersuchungen [SM2]. Im Zuge dieser Analysen wurden Datenbanken erstellt, um Milchkeime und im Speziellen *Brucella* spp. von nah verwandten Gattungen zu differenzieren [SM3].

Da viele Lebensmittelerkrankungen zudem mit dem Verzehr von Fleisch und Fleischprodukten verbunden sind, war die Detektion von humanpathogenen Erregern aus Fleisch ebenfalls Gegenstand dieser Dissertation. Nach Erstellung eines geeigneten Klassifizierungsmodells wurde das System mit Hilfe von gezielt mit Keimen versetzten Rinderhack- und Hähnchenbrustproben validiert, um dessen Anwendungsfähigkeit in der Lebensmitteldiagnostik zu prüfen [SM4].

### 1.4.1 Detektion von *Bacillus*-Endosporen

Nachdem bereits im Vorfeld dieser Dissertation Raman-mikrospektroskopische Analysen über den Einfluss der Manganzugabe während der Kultivierung von *Bacillus*-Endosporen [144] und die Entwicklung eines sicheren, Raman-kompatiblen Inaktivierungsverfahrens für hochpathogene Keime durchgeführt worden sind [145], sollte in dieser Arbeit die Differenzierbarkeit von Endosporen verschiedener *Bacillus*-Spezies, insbesondere von *Bacillus anthracis* und anderen Vertretern der *Bacillus cereus*-Gruppe untersucht werden.

**Aufbau und Validierung einer *Bacillus*-Endosporen-Datenbank**

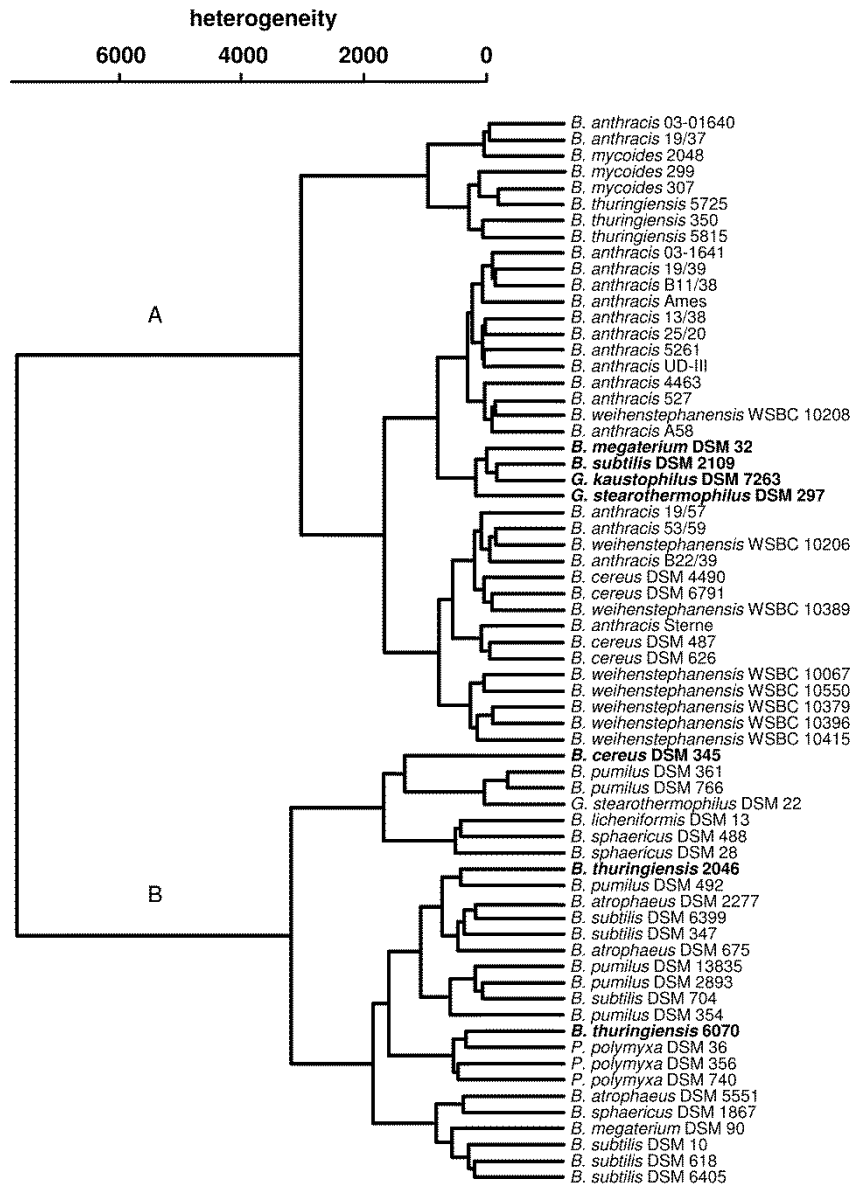
Die Gattung *Bacillus* bildet eine der größten Endosporen bildenden Gruppen und umfasst aerobe Bakterien mit einer enormen physiologischen und genetischen Vielfalt. Vor allem die *Bacillus cereus*-Gruppe, nachfolgend als CG bezeichnet, ist dabei von hohem wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Interesse. Obwohl die Taxonomie der Gruppe teilweise kontrovers ist, kann man folgende Vertreter darunter zusammenfassen: (1) *B. cereus*; (2) *B. anthracis*; (3) *B. thuringiensis*; (4) *B. mycoides*; (5) *B. pseudomycoides* und (6) *B. weihenstephanensis*.

Dennoch machen besonders deren oft mehrdeutige taxonomische Wechselbeziehungen eine Diskriminierung zwischen den einzelnen Spezies schwierig.

Um die enorme Vielfalt der Spezies zu erfassen und vor allem eine Raman-Spektroskopie-basierte Trennung der pathogenen (u.a. *B. anthracis* oder *B. cereus*) und nicht pathogenen (z. B. *B. thuringiensis*) Erreger zu realisieren, musste eine Raman-Datenbank mit einer Vielzahl an *Bacillus* und *Bacillus* verwandten Spezies aufgestellt werden. In Summe wurden 66 Stämme von 13 *Bacillus*-Arten, insbesondere der *Cereus*-Gruppe und nah verwandter Gattungen, wie *Geobacillus* spp. und *Paenibacillus* spp., für die Untersuchungen herangezogen. Eine Übersicht der untersuchten Stämme befindet sich in Tabelle 1 [SM1].

Um den Umgang mit den teils hochpathogenen Keimen abzusichern, wurden alle Bakterien mit einer 10 %igen Formaldehydlösung für eine Stunde inaktiviert. Zudem wurde darauf geachtet, dass alle Keime mit denselben Kultivierungsparametern angezogen und stets mit den gleichen Messbedingungen detektiert wurden. Letztendlich wurden spektrale Fingerabdrücke von 10.759 einzelnen Endosporen aufgenommen.

Mit dem Impuls, die Raman-Daten zu strukturieren, wurde eine HCA zur Feststellung spektraler Ähnlichkeiten durchgeführt. Resultat dieser Analyse war die Einteilung der Daten in zwei Hauptcluster (siehe Dendrogramm Abbildung 1): Während ein Ast vorwiegend die Spektren der Stämme, die der *Bacillus cereus*-Gruppe angehören, zusammenfasst (A), werden in dem Zweiten alle Spektren der nicht *Bacillus cereus*-Stämme, bis auf wenige Ausnahmen, gruppiert (B). Nachfolgend werden die Stämme deshalb ihrer taxonomischen Einordnung entsprechend in einer *Cereus*-Gruppe (CG) und einer nicht *Cereus*-Gruppe (NCG) zusammengefasst.



**Abbildung 1:** Resultierendes Dendrogramm einer HCA (euklidische Distanz, Ward's Algorithmus) der Mittelwert-Raman-Spektren von 66 *Bacillus*, *Geobacillus* und *Paenibacillus* Stämmen. Fehlklassifizierte Spektren sind in fetter Schrift gekennzeichnet.

Mit diesen zugrundeliegenden Erkenntnissen wurde ein zweistufiges Klassifizierungskonzept entwickelt: So werden die Spektren in einem ersten Schritt entweder der CG- oder NCG-Gruppe zugeordnet, während im zweiten Schritt die Zuordnung der Spektren auf Art-Ebene erfolgt. Der Klassifizierungsbaum wurde im Schema 1 [SM1] grafisch dargestellt. Hinter dem Top-Level-Klassifizierer verbirgt sich eine SVM mit radialem Kernel. Diese findet auch bei der Unterscheidung der CG-Mitglieder Anwendung. Im Gegensatz dazu wird die Einordnung der Spektren in die NCG-Gruppe durch eine

Kombination aus PCA und LDA gewährleistet. Somit werden an jedem Knotenpunkt optimierte Klassifizierer eingesetzt, welche zusätzlich durch eine Kreuzvalidierung evaluiert wurden: 99,3 % der 10.759 Spektren konnten mit dem Top-Level-Klassifizierer richtig in die jeweilig zugehörige Gruppe eingeordnet werden. Die 6.063 Spektren der CG-Gruppe konnten mit einer Genauigkeit von 97,1 % korrekt zu einer der fünf Spezies *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis* zugeordnet werden. Mit einer Zuordnungsrate von 93,1 % wurden dagegen die Spektren der NCG-Gruppe (4.696 Spektren) richtig als *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Geobacillus* spp. oder *P. polymyxa* erkannt.

Unabhängig von den für die Datenbank generierten Batches wurden 27 „unbekannte“ Testproben hergestellt, Raman-spektroskopisch vermessen und zur Validierung des Modells herangezogen. Sieben der Proben enthielten Keime mit, für die Datenbank, unbekannten Stämmen, wodurch das System zusätzlich auf seine Robustheit überprüft werden konnte. Datenbankspezies, welche nur durch zwei *Bacillus*-Stämme charakterisiert werden, wurden für diese *Leave-one-strain-out*-Validierung nicht berücksichtigt.

Die 27 Testproben wurden auf Basis des Zwei-Level-Modells identifiziert, wobei eine Zuordnung als signifikant eingestuft wurde, wenn mindestens 85 % der Spektren einer Klasse zugeordnet wurden. Die Resultate der Testproben sind in Tabelle 2 [SM1] zusammengefasst.

Im ersten Schritt wurden alle 27 Testproben korrekt in die CG oder NCG-Gruppe mit einer Genauigkeit von 99,4 % eingestuft. Daraufhin wurden die vermeintlich 15 CG-Proben auf Basis der SVM auf Spezies-Level charakterisiert. Dabei wurden alle Proben mit Genauigkeiten von 88,4 % (Probe 20, *B. thuringiensis*) bis zu 100 % (Probe 3, *B. anthracis*; Probe 21, *B. thuringiensis*) treffend eingeordnet. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die beiden *B. cereus*-Proben und alle sechs *B. anthracis*-Proben richtig als solche erkannt wurden. Dabei traten für *B. anthracis* lediglich 10 Falsch-negative und 15 Falschpositive anderer Spezies auf. Auch die Proben 6 (*B. anthracis*), 9 (*B. cereus*), 22 (*B. thuringiensis*) und 25 (*B. weihenstephanensis*), deren Stämme der Datenbank unbekannt waren, wurden eindeutig den korrekten Spezies zugeordnet. Insgesamt konnten 1.424 von 1.467 Raman-Spektren der CG-Gruppe, was einer Genauigkeit von 97,1 % entspricht, richtig gelabelt werden. Außerdem wurden die



beiden pathogenen *Bacillus* spp., *B. anthracis* und *B. cereus*, korrekt identifiziert und konnten somit von den anderen nicht pathogenen Spezies differenziert werden.

Auch die 12 Proben der NCG-Gruppe konnten durch die Anwendung der LDA mit vorgelagerter PCA zur Dimensionsreduzierung ihren entsprechenden Spezies zugewiesen werden. Außer für Probe 16 (*B. sphaericus*, 93,1 %) konnten Erkennungsraten von über 97 % erzielt werden. Somit erreichte der Klassifizierer für die Testproben eine Gesamtgenauigkeit von 98,6 %, da 1.367 von 1.387 Spektren richtig zugeordnet wurden. Selbst die unbekannten Stämme wurden ebenfalls mit Sensitivitäten im Bereich der anderen Spezies problemlos erkannt: Probe 15 (*B. pumilus*), Probe 17 (*B. sphaericus*) und Probe 19 (*B. subtilis*).

Zusammenfassend wurden alle Testproben richtig identifiziert. Schlussfolgernd kann des Weiteren davon ausgegangen werden, dass kein Problem durch Überanpassung gegeben ist.

Besonders die *Bacillus anthracis* und *Bacillus cereus*-Proben 1 bis 9, welche es im Hinblick auf die Lebensmitteldiagnostik zu berücksichtigen galt, konnten problemlos von nicht pathogenen Vertretern der Gattung *Bacillus* abgetrennt und zudem mit hohen Raten von 92,1 % bis 100 % identifiziert werden.

### **Identifizierung von Umweltproben**

Die Detektion von Endosporen aus komplexen Matrices, wie Lebensmitteln oder weißen Pulvern, welche oft im Zusammenhang mit bioterroristischen Anschlägen gebracht werden, stellt eine große Herausforderung für zahlreich etablierte Methoden, wie der PCR, dar. Dass die Raman-Mikrospektroskopie in Kombination mit einem einfachen und schnellen Isolierungsschritt ein geeignetes Verfahren ist, dieser Aufgabe gerecht zu werden, konnte bereits im Vorfeld dieser Dissertation gezeigt werden. Stöckel et al. entwickelte ein Ablaufschema, welches die Inaktivierung, die Isolierung, und die Raman-spektroskopische Detektion von Endosporen in weißen Pulvern (u. a. Backpulver, Gips, Milchpulver, Natron, Schmerztabletten, Vogelsand, Waschmittel) innerhalb von drei Stunden nach Probennahme ermöglicht [146].

Um die Stabilität des Klassifizierungsmodells basierend auf der erstellten Datenbank weiter zu testen, wurde versucht, acht Proben von Endosporen aus künstlich kontaminierten Haushaltspulvern (Salz, Vogelsand, Milchpulver und Backpulver),

nachfolgend mit P1 bis P8 nummeriert, zu detektieren. Die Resultate dieses Identifizierungsprozesses sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Resultate der acht isolierten Endosporen-Proben aus Haushaltspulvern nach Durchlaufen des Klassifizierungssystems

Probe	Klasse	Matrix	Top-Level			Spezies-Level			
			CG	NCG	Resultat	TP/alle	Sens.	Klasse FP	Resultat
P1	Bant	Salz	108	1	<b>CG</b>	97/109	89,0 %	Bthu (8) Bwei (3) Bmyc (1)	<b>Bant</b>
P2	Bant	Salz	82	0	<b>CG</b>	68/82	82,9 %	Bthu (12) Bwei (2)	<b>Bant</b>
P3	Bmeg	Vogelsand	6	53	<b>NCG</b>	52/59	88,1 %	Ppol (5) Bpum (2)	<b>Bmeg</b>
P4	Bmeg	Vogelsand	7	58	<b>NCG</b>	64/65	98,5 %	Ppol (1)	<b>Bmeg</b>
P5	Bsub	Milchpulver	0	100	<b>NCG</b>	99/100	99,0 %	Batr (1)	<b>Bsub</b>
P6	Bsub	Milchpulver	0	100	<b>NCG</b>	100/100	100 %	-	<b>Bsub</b>
P7	Bthu	Backpulver	100	1	<b>CG</b>	98/101	97,0 %	Bmyc (2) Bwei (1)	<b>Bthu</b>
P8	Bthu	Backpulver	76	0	<b>CG</b>	76/76	100 %	-	<b>Bthu</b>

CG = *Cereus*-Gruppe, NCG = nicht *Cereus*-Gruppe, Sens. = Sensitivität

TP = Richtig-Positive, FP = Falsch-Positive

Bant (*B. anthracis*), Bmeg (*B. megaterium*), Bsub (*B. subtilis*), Bthu (*B. thuringiensis*), Bwei (*B. weihenstephanensis*), Bmyc (*B. mycoides*), Bpum (*B. pumilus*), Ppol (*P. polymyxa*), Batr (*B. atrophaeus*)

Sowohl nach Durchlaufen des Top-Level-Klassifizierers, als auch der Klassifizierer für die Einordnung der Spezies konnten nachfolgend alle acht Identifizierungsproben unabhängig von der Matrix zufriedenstellend mit Sensitivitäten im Bereich von 82,9 % (P1, *B. anthracis* aus Salz) bis 100 % (P6, *B. subtilis* aus Milchpulver; P8, *B. thuringiensis* aus Backpulver) identifiziert werden.

Schlussfolgernd zeigt sich in dieser Studie wieder die hohe Sensitivität und Spezifität der Raman-Spektroskopie. Das Potenzial für die Differenzierung von Bakterien aus komplexen Lebensmitteln, wie Milch und Fleisch, war Thema der folgenden Untersuchungen.

### 1.4.2 Isolierung und Identifizierung von Milchkeimen

„Eine Nadel im Heuhaufen finden“ – So bezeichnen Mikrobiologen die Problematik, eine geringe Anzahl von Keimen aus ihrer komplexen Umgebung, ohne vorgelagerte Kultivierungsschritte zur Zellzahlerhöhung, zu extrahieren [147]. Dennoch sind Isolierung und Konzentrierung oft unumgängliche Schritte, um die Mikroben eindeutig zu identifizieren. Deswegen ist es notwendig, Isolierungsverfahren zu evaluieren und hinsichtlich ihrer Kompatibilität mit dem angedachten Detektionsverfahren zu untersuchen, bevor eine Analyse der Erreger erfolgen kann.

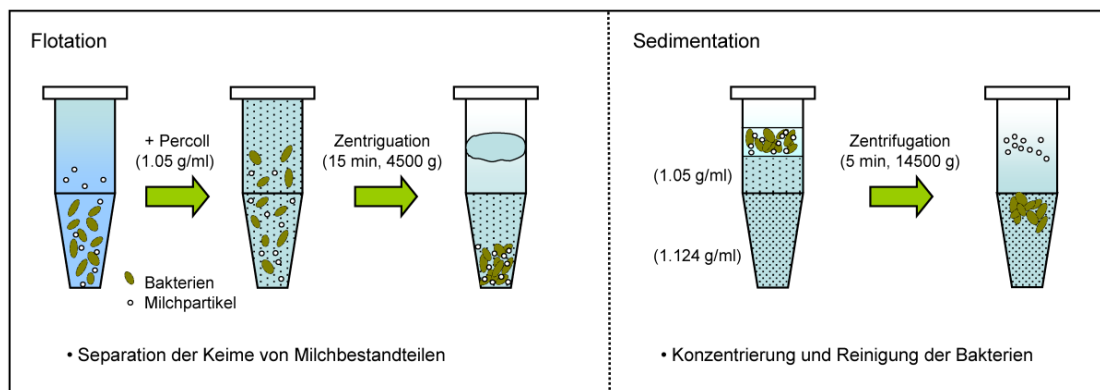
#### **Evaluierung von Extraktionsmethoden zur Kompatibilitätsprüfung für Raman-spektroskopische Analysen von Milchkeimen**

Um das Potenzial Raman-spektroskopischer Analysen von Bakterien aus komplexen Proben, wie Milch, voll auszuschöpfen, sollte ein vorgelagerter Isolierungsschritt folgenden Anforderungen genügen: Die Matrix und das Isolierungsverfahren dürfen die Integrität der Zelle insoweit nicht beeinflussen, dass eine Raman-spektroskopische Analyse ganzer Zellen gewährleistet bleibt. Da sich Änderungen in der Zellstruktur im Raman-Signal widerspiegeln und somit das Diskriminierungspotenzial der Methode einschränken können, muss darauf geachtet werden, welche Einflüsse die verwendeten Chemikalien und Laborgeräte auf die Bakterien ausüben.

Ein physikalisches und ein biochemisches Verfahren wurden ausgewählt, um deren Kompatibilität für Raman-Studien zu überprüfen: eine Dichte-Gradienten-Zentrifugation und eine enzymatische Verdauung.

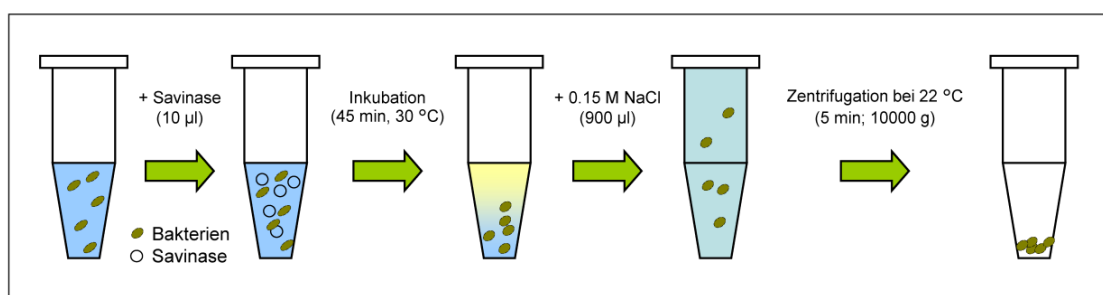
Die Dichte-Gradienten-Zentrifugation (engl.: *buoyant density centrifugation*, BDC) ermöglicht eine selektive Auftrennung von Partikeln nach ihrer Schwebedichte mithilfe eines Dichte-Gradienten. Die Vorteile dieser Präparationsmethode zeigen sich darin, dass neben einer simplen Handhabung die Funktionsfähigkeit der mikrobiellen Zellen aufrechterhalten bleibt und so die Analyse intakter Zellen möglich ist. In Anlehnung an die Literatur wurde für die Separation der Keime aus Milch eine wässrige Suspension mit Polyvinylpyrrolidon beschichteten Siliziumdioxidpartikeln (Percoll) als Trennlösung verwendet [147, 148]. In Abbildung 2 ist das angewandte Verfahren schematisch dargestellt: Im ersten Schritt, der Flotation, werden die Milchbestandteile und die Bakterien aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten mithilfe einer Percolldichte von 1,05 g/ml aufgetrennt. Im weiteren Verlauf, der Sedimentation, bedient man sich eines

Percollgradienten mit zwei Dichten, um die Bakterien weiter zu konzentrieren und aufzureinigen.



**Abbildung 2:** Zweistufige Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Percoll als Gradientenmedium zur Separation von Keimen aus Milch im Vorfeld einer Raman-spektroskopischen Untersuchung

Die enzymatische Verdauung der Milchbestandteile kann durch das Enzym Savinase gewährleistet werden. Bei dem als *milk clearing* (MC) bezeichnete Verfahren katalysiert Savinase die Hydrolyse der Peptidbindungen der Milchproteine [149]. Durch die Erweiterung des Verfahrens mit einem Zentrifugationsschritt wird die Gewinnung eines Bakterienpellets, welches frei von Milchproteinen und -fetten ist, möglich. Der Isolierungsvorgang ist nachfolgend schematisch abgebildet (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Isolierung von Keimen aus Milch mittels enzymatischer Verdauung von Milchpartikeln mit Savinase

Nach Zugabe von 10 µl Savinase zur Milch wird die Probe für 45 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe mit einer 0,15 M Natriumchlorid-Lösung gespeist und zentrifugiert.

Für die Studie wurde ultrahocherhitzte, kommerziell erhältliche Milch (UHT-Milch) mit bekannten Milchkeimen (*Pseudomonas* spp. und *E. coli*) versetzt und die Isolierungsmethoden daraufhin hinsichtlich Ausbeute und Raman-Kompatibilität untersucht.

Die Ausbeute wurde über eine Lebendzellzahlbestimmung für die mit *E. coli* versetzten Proben im Konzentrationsbereich von  $10^3$  bis  $10^8$  Zellen je 500  $\mu$ l Milch evaluiert: Mit BDC konnten unabhängig von der Eingangskonzentration 10 % bis 30 % der Keime wiedergewonnen werden. Dabei ist das Ergebnis konform mit Resultaten aus anderen Publikationen und geht mit einem Verlust einer Größenordnung der mikrobiellen Ausgangskonzentration einher. Die Ausbeuten für MC schwanken dagegen stark und nehmen Werte zwischen 9 % und 53 % abhängig von der Inokulationskonzentration an. Ursache hierfür könnte eine bakterizide Wirkung des Enzyms sein [150], welche jedoch bisher nicht hinreichend untersucht ist [151].

Beide Methoden ermöglichen die Isolierung von Bakterien aus Milch mit hinreichender Quantität, um anschließende Raman-spektroskopische Untersuchungen zu ermöglichen. Dennoch muss berücksichtigt werden, dass ein Teil der MC-isolierten Keime nicht länger aktiv sein könnten, wodurch die Raman-spektroskopische Detektion eingeschränkt würde.

Um die Einflüsse der Extraktionsmethoden auf die Zellen zu untersuchen, wurden Raman-Spektren von unbehandelten Zellen mit Spektren isolierter Zellen verglichen. Dabei wurden die Bakterien sowohl aus Wasser als auch aus Milch untersucht, um Extraktionseffekte zu erfassen. Im Vergleich zu den Spektren unbehandelter Zellen konnten nur minimale spektrale Unterschiede wahrgenommen werden. Auch wenn die Spektren der einzelnen Klassen (unbehandelt, aus Wasser oder Milch isoliert) einer Spezies für BDC (siehe Fig. 1(B) [SM2]) und MC (siehe Fig. 2(B) [SM2]) mit einer linearen Diskriminanzanalyse (LDA) analysiert werden, wird deutlich, dass sich die Spektren so ähneln, dass eine klare Diskriminierung der einzelnen Klassen kaum möglich ist.

Zur Ermittlung des Diskriminierungspotenzials der isolierten Keime wurden Spektren von den Bakterien *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* und *Escherichia coli* aufgenommen und anschließend chemometrisch untersucht. Dabei wurden ein Teil der Spektren für die Erstellung eines Klassifizierungsmodells herangezogen. Die anderen unabhängigen Messungen wurden nachfolgend genutzt, um

eine Identifizierung zu simulieren. Die chemometrische Auswertung erfolgte analog zur Klassifizierung.

In Summe wurden 372 Raman-Spektren der BDC-isolierten Bakterien zur Klassifizierung genutzt, von denen 290 Spektren nach einer *leave-one-out* Kreuzvalidierung richtig ihren entsprechenden Klassen zugeordnet wurden. Dementsprechend weist das Modell eine Genauigkeit von 96 % auf. Mit einer hohen Genauigkeit von 91 % konnten anschließend die unabhängig kultivierten und gemessenen Raman-Spektren auf Spezies-Level identifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 [SM2] zusammengefasst. Dasselbe Verfahren wurde auf die MC-isolierten Keime angewandt, wobei 88 % der Klassifizierungsdaten richtig zugeordnet wurden. Fehlklassifizierungen traten vor allem zwischen den einzelnen *Pseudomonas*-Spezies auf. Dies schlägt sich auch in den Identifizierungsraten nieder. Während 98,3 % der Spektren richtig als *E. coli* eingeordnet werden, können die einzelnen Pseudomonaden nur mäßig identifiziert werden (Tab. 3 [SM2]). Insgesamt können 78 % der unabhängigen Spektren korrekt zugeordnet werden.

Beide Methoden sind, in einem simplen Präparationsschritt mit geringem Probenvolumen und innerhalb einer Stunde, zur Separation und Konzentrierung von Bakterien aus Milch geeignet. Jedoch weist BDC eine bessere Kompatibilität im Hinblick auf Raman-spektroskopische Messungen auf als MC, welches sich in den Klassifizierungs- und Identifizierungsergebnissen niederschlägt. Die deutlich schlechteren Resultate für MC-isolierte Bakterien deuten daraufhin, dass eine bakterizide Wirkung des Enzyms Savinase nicht ausgeschlossen werden kann [150], welche zu abweichenden spektralen Informationen und somit zur Limitierung der Identifizierung führen können.

### **Detektion von *Brucella* spp. und genetisch nah verwandten Erregern aus Milch**

Mit einer geeigneten Isolierungsmethode zur Hand sollte nachfolgend die Detektion von mikrobiellen und pathogenen Milchkontaminationen möglich sein. Dabei wurde die Zielstellung verfolgt, aus Milch isolierte *Brucella* spp. zu detektieren und von genetisch nah verwandten Erregern zu differenzieren.

### ***Aufbau einer Datenbank***

Der Umgang mit *Brucella* spp. erfordert besondere Aufmerksamkeit, da die kleinen, Gram-negativen und in Risikogruppe 3 eingestuften Kokken ein hohes Gefahrenpotenzial aufzeigen. Eine Ursache ergibt sich aus der Tatsache, dass die Erreger in westlichen Ländern nur sehr selten auftreten, wodurch die Laborroutine und das Fachpersonal im Umgang mit den Erregern oft nicht vertraut ist. Zudem gibt es Hinweise auf Probleme bei der Detektion von *Brucella* mit etablierten Analysemethoden. Das zeigt sich deutlich in zahlreichen falschen Zuordnungen, wenn es darum geht, *Brucella* von genetisch nah verwandten Gattungen, wie *Ochrobactrum* oder *Yersinia*, zu differenzieren. Ein weiteres Problem zeigt sich im Hinblick auf das bioterroristische Potenzial der Keime, da schon die Aufnahme einer geringen Anzahl von Erregern genügt, um eine Brucellose auszulösen. In diesem Zusammenhang ist eine willentliche Ausbringung der Keime in kommerziell erhältlicher Milch nur eines von vielen Schreckensszenarien.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden neben verschiedenen virulenten *Brucella* spp. (7 Spezies, 13 Subspezies), *Ochrobactrum* spp. (2 Spezies, 4 Stämme) und *Yersinia enterocolitica* (2 Stämme/ Serovare), auch andere Gram-negative Keime, die typischerweise in Milch zu erwarten sind, wie *Pseudomonas* spp. (5 Spezies, 6 Subspezies) und *E. coli* (2 Stämme) für eine nachfolgende Betrachtung in Erwägung gezogen.

Um das Diskriminierungspotenzial der Raman-Mikrospektroskopie hinsichtlich der verschiedenen genetisch ähnlichen Gattungen und der *Brucella*-Spezies ohne Matrixeinflüsse zu beurteilen, wurde zunächst eine Raman-Datenbank mit Spektren von auf Nährmedium kultivierten und mit Formaldehyd inaktivierten Keimen aufgenommen. Zudem wurde die Performance von zwei Klassifizierungsalgorithmen, einer PCA-LDA und einer SVM verglichen, um letztlich ein bestmöglich optimiertes Modell zur Differenzierung der in die Datenbank eingespeisten Arten zu gewährleisten. Die Modelle wurden nachfolgend mit unabhängig präparierten und gemessenen Batches der einzelnen Spezies validiert.

In Summe wurden für die Differenzierung der Gattungen 2.610 Raman-Spektren zur Klassifizierung und 1.151 Raman-Spektren einzelner Bakterienzellen zur Validierung genutzt.

Unter Verwendung von 88 Hauptkomponenten (PCs) wurde eine Genauigkeit von 92,9 % für das PCA-LDA-Modell erzielt. In der Validierung wurden 1.045 von 1.151

Raman-Spektren (90,8 %) den richtigen Klassen zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 [SM3] in der Spalte „LDA“ im Einzelnen aufgeschlüsselt. Mit einer Sensitivität von 96,8 % konnten die *Brucella* spp. von den anderen Gattungen abgetrennt werden. Die Spektren von *Ochrobactrum* wurden dagegen nur mit einer Genauigkeit von 72,9 % (153 von 210 Raman-Spektren) identifiziert, wobei die Fehlidentifizierungen zumeist der *Brucella*-Klasse zugeordnet werden konnten (siehe Tabelle A2 [SM3]).

Im weiteren Verlauf wurden die Daten durch Verwendung einer SVM mit radialer Basisfunktion mit einer Genauigkeit von 98,8 % trainiert. Auf Basis dieses Modells konnten 91,8 % der Spektren richtig identifiziert werden. Durch Ausnutzung des SVM-Algorithmus konnten die Ergebnisse für die Detektion von *Ochrobactrum* leicht verbessert werden. Die Spektren wurden mit einer Genauigkeit von 77,1 % erkannt. Die fehlerhaften Einordnungen konnten wiederum *Brucella* und *Pseudomonas* zugeordnet werden.

Sowohl mit der PCA-LDA, als auch mit der SVM konnten die Raman-Daten mit hohem Genauigkeitsgrad trainiert werden. In der anschließenden Validierung mit „unbekannten“ Batches zeichnet sich außerdem ab, dass unabhängig vom Klassifizierungsalgorithmus *Brucella* spp. von genetisch nah verwandten Gattungen mittels Raman-Spektroskopie differenziert werden können. Eine spektrale Analyse der Mittelwertspektren der einzelnen Gattungen, welche vergleichend mit den *loading*-Vektoren einer LDA mit 5 PCs in Zweiklassenproblematiken erstellt wurden, deutet ebenfalls drauf hin, dass sich die Raman-Spektren der untersuchten Gattungen in Positionen und Intensitäten bekannter DNA- und Proteinbanden von den *Brucella*-Spektren unterscheiden. In Abbildung 1 [SM3] sind diese Ergebnisse grafisch zusammengefasst.

Um zu evaluieren, ob die Modelle stabil gegenüber der Detektion „unbekannter“ Stämme sind, wurden sechs unabhängig kultivierte und nicht in der Datenbank integrierte *Brucella*-Biovar-Proben hergestellt und versucht auf Basis des PCA-LDA-Modells zu identifizieren. Von den 324 erzeugten spektralen Raman-Daten konnten 307 Signale korrekt der Gattung *Brucella* zugeordnet werden. Falsch klassifizierte Spektren wurden in diesem Zusammenhang überwiegend *Pseudomonas* zugeordnet. Eine exakte Aufschlüsselung der Resultate befindet sich in Tabelle 3 [SM3]. Eine Evaluierung der „unbekannten“ Spektren, basierend auf der SVM, zeigten ähnliche Resultate.



**Diskriminierung einzelner *Brucella* spp.**

Ein weiterer Aspekt der Studie war die Erörterung der Diskriminierbarkeit verschiedener *Brucella* spp.. Dementsprechend wurden mit den Spektren der sieben analysierten, auf Medium kultivierten *Brucella* spp. (*B. abortus*, *B. canis*, *B. ceti*, *B. melitensis*, *B. microti*, *B. pinnipedialis* und *B. suis*) neue Modelle auf Basis einer PCA-LDA und SVM erstellt und anschließend mit einem, nicht im Trainingssatz integrierten, Batch validiert. Die Resultate sind in Tabelle 4 [SM3] zusammengetragen. Das aus der PCA (86 PCs)-LDA resultierende Klassifizierungsergebnis gibt an, dass 85,7 % der Spektren nach einer *leave-one-out* Validierung richtig ihren Klassen zugeordnet werden konnten. Die Sensitivitäten variieren dabei im Bereich von 75,0 % (*B. melitensis*) bis 87,7 % (*B. abortus*), wobei häufig Falschklassifizierungen von *B. melitensis* als *B. abortus* und umgekehrt auftraten. Nach Rotation des Identifizierungsdatensatzes in den spektralen Raum der Klassifizierungsdaten und anschließender LDA konnte eine Identifizierungsrate von 79,6 %, mit Sensitivitäten zwischen 60,0 % (*B. ceti*) und 91,8 % (*B. canis*), ermittelt werden. Weitere Resultate können der Tabelle A6 [SM3] entnommen werden.

Die Generierung des Trainingsmodells mit der SVM erbrachte eine Gesamtgenauigkeit von 99,4 %, mit denen 83 % der Testproben richtig identifiziert werden konnten. Dabei sind zwar die Resultate der Klassifizierung (speziesbezogene Sensitivitäten > 96 %) deutlich besser als die des PCA-LDA-Modells, dennoch unterscheiden sich die Identifizierungsergebnisse nur geringfügig. Die Ergebnisse wurden für einen Vergleich in Tabelle A7 [SM3] zusammengetragen.

Daraus ergibt sich, dass eine Differenzierbarkeit von *Brucella* auf Art-Ebene zwar gegeben, aber im Hinblick auf die Identifizierung unabhängiger Proben nicht optimal ist. Dabei scheint nicht nur die Raman-Spektroskopie durch die hohe genetische Homologie (> 90 %) der einzelnen *Brucella* spp., sowie deren umstrittene taxonomische Nomenklatur limitiert zu sein. Auch andere Fingerabdruck-basierte Methoden, wie die Massenspektrometrie, oder genetische Analysen, wie die PCR, können eine exakte Unterscheidung der *Brucella*-Spezies nicht gewährleisten [152, 153].

**Detektion von *Brucella*-Kontaminationen in Milch**

Da sich die Diskriminierung der Brucellen von den anderen Gattungen als erfolgreich erwiesen hat, wurde ein Modell erarbeitet, welches eine Detektion von Brucellen als Milchkontamination erlaubt.

So wurde kommerziell erhältliche 1,5 %ige Milch mit den zuvor auf Medium präparierten Spezies in einer Konzentration von  $10^7$  Zellen pro Milliliter gezielt kontaminiert und nach einem Tag Lagerung (24 h, 4 °C) analysiert. Vor der eigentlichen Raman-spektroskopischen Messung wurden die kontaminierten Milchproben mit einer 10 %igen Formaldehydlösung für eine Stunde inaktiviert. Die anschließende zentrifugale Konzentrierung der Bakterien in einem Pellet und die Entfernung des Überstandes machte eine weitere Isolierung obsolet. Im Falle von real kontaminierten Milchproben, bei denen Zellzahlen im Bereich von  $10^3$  bis  $10^5$  Keime pro Milliliter zu erwarten sind, kann ein zusätzlicher Extraktionsschritt, wie die zuvor evaluierte Dichte-Gradienten-Zentrifugation, alternativ vor der spektroskopischen Analyse angewandt werden.

Mit den so produzierten Proben konnte eine weitere Datenbank mit 2.140 Raman-Spektren einzelner Zellen aufgenommen werden. Zudem wurden weitere 1.078 Spektren von unabhängig präparierten Proben zur Validierung gemessen. Alle Daten wurden erneut sowohl mit einer PCA-LDA, als auch mit einer SVM ausgewertet (siehe Tabelle A4 und A5 [SM3]). Die Werte von 67 Hauptkomponenten der Klassifizierungsdaten wurden den Datenalgorithmus der LDA ausnutzend mit einer Genauigkeit von 92,5 % klassifiziert. Auf der Basis dieses Modells konnten 92,4 % der 1078 Testspektren richtig ihrer entsprechenden Klasse zugeordnet werden. Die Ergebnisse konnten durch die Anwendung einer SVM noch verbessert werden. Lediglich 54 der 2140 Trainingsdaten wurden falsch klassifiziert (97,5 %). Die Berechnung der Identifizierungsdaten ergab eine Erkennungsrate von 95,8 %. Dementsprechend konnten 94,0 % der *Brucella*-Spektren und 93,6 % der *Ochrobactrum*-Spektren korrekt identifiziert werden. Die Sensitivitäten der anderen Milchkontaminanten lagen zudem noch höher: *Escherichia* wurde mit 100 % erkannt, während *Pseudomonas* mit 97,8 % und *Yersinia* mit 96,2 % detektiert wurde.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Raman-Mikrospektroskopie in Kombination mit einem geeigneten chemometrischen Verfahren eine Detektion von *Brucella* - mit einem hohen Diskriminierungspotenzial gegenüber genetisch schwer differenzierbaren Gattungen - bewerkstelligt. Außerdem war es möglich, aus Milch isolierte Brucellen mit einer Sensitivität von 94 % zu detektieren. Die Differenzierung von *Brucella* auf Art-Ebene konnte ebenfalls gezeigt werden. Lediglich die Identifizierung unabhängiger Proben der verschiedenen *Brucella* spp. ist optimierbar, zeigt jedoch ähnliche oder sogar bessere Resultate als andere Methoden im Vergleich.

### **1.4.3 Detektion von pathogenen Keimen aus Fleisch**

Da sich das Konzept Raman-spektroskopischer Analyse mit vorgelagerter Isolierung und anschließender statistischer Auswertung für die Detektion von mikrobiellen Milchkontaminationen bewährt hat, sollte diese Vorgehensweise auf andere Szenarien anwendbar sein. Mit dem Ziel eine Raman-spektroskopische Identifizierung von pathogenen Keimen aus Fleischprodukten zu gewährleisten, wurde eine Datenbank mit fleisch- und geflügelassozierten Erregern erstellt, welche nachfolgend den Abgleich unabhängig gemessener Raman-Spektren von, aus Fleischprodukten isolierten, Erregern erlaubt.

#### **Aufbau eines dreistufigen Klassifizierungsmodells**

In diesem Zusammenhang wurden spektrale Fingerabdrücke von 19 verschiedenen Spezies erfasst; darunter bekannte pathogene Lebensmittelkeime, wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* und *Yersinia enterocolitica*, aber auch genetisch nah verwandte, nicht pathogene Keime derselben Gattungen. In Summe wurden 4.622 Raman-Spektren von insgesamt 24 Stämmen, welche in Tabelle 1 [SM4] zusammengefasst sind, detektiert. Mit dem Hintergrund, dass sich Keime besser detektieren lassen, wenn sie sich in einer ähnlichen Umgebung befinden, wurde versucht, die Fleischmatrix so realistisch wie möglich abzubilden. Dafür wurde jeder Keim auf drei verschiedenen Agartypen, welche alle aus Fleischkomponenten hergestellt wurden, kultiviert: BA (Columbia Blutagar), BHI (*brain heart infusion*) und MHA (Müller-Hinton-Agar). Um zusätzlich realistische

Streuungen innerhalb der Proben zu erfassen, wurden für jede Probe mindestens vier unabhängige Batches präpariert.

Um den Einfluss der verschiedenen Kultivierungsmedien auf die Raman-Spektren zu untersuchen, wurden aus allen Spektren einer Spezies die Mittelwerte und deren doppelte Standardabweichung berechnet, sodass alle Kultivierungsparameter berücksichtigt werden konnten. In Abbildung 1 [SM4] sind die Mittelwertspektren und die dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt. Zudem wurde eine normalisierte Standardabweichung pro Spezies berechnet. Setzt man dann die Standardabweichung der einzelnen Kanäle in das Verhältnis zu den Werten der Standardabweichung der gemittelten Kanäle, erhält man einen statistisch relevanten Wert, der eine Aussage über die Variabilität innerhalb der Spektren und deren Reproduzierbarkeit zulässt. Nachfolgend wird dieser Wert als SDM (*standard deviation means*) bezeichnet. Die SDM-Werte der einzelnen Spezies sind in Tabelle 1 [SM4] zusammengefasst. Kleine SDM-Werte zeigen eine kleine spektrale Kanalvariabilität und somit eine hohe Reproduzierbarkeit innerhalb des Datensatzes auf, wohingegen hohe Werte im Bereich von 1 auf hohe Fluktuationen innerhalb einzelner Kanäle hindeuten, welche die Belastbarkeit der Daten infrage stellt. Alle berechnenden Werte sind signifikant kleiner als 1 im Bereich von 0.12 und 0.18. Somit zeigt sich, dass die beobachtete Raman-Information weitestgehend unabhängig von den verschiedenen Kultivierungsmedien ist. Die Aufstellung eines Klassifizierungssystems mit den zugrundeliegenden Daten sollte demnach gewährleistet sein.

In einem ersten Versuch die Daten zu strukturieren, wurde sich eine unbewachten Auswertung verwendet. Die Mittelwertspektren der 24 Stämme wurden in die Clusteranalyse eingespeist und unter Verwendung des Ward's Algorithmus und Bestimmung der euklidischen Distanz ihrer Heterogenität entsprechend aufgeschlüsselt. Das daraus resultierende Diagramm kann in Abbildung 2 [SM4] eingesehen werden. Die Spektren wurden dabei vorwiegend in zwei Hauptcluster unterteilt. Dabei bilden alle Gram-positiven Spezies und das Spektrum von *Yersinia rohdei* Cluster A und alle anderen Gram-negativen Spezies Cluster (B).

Diese auf die Raman-Spektren übertragene taxonomische Information wurde nachfolgend bei der Erstellung eines dreistufigen Klassifizierungsbaums (siehe Grafik 3 [SM4]) berücksichtigt.

Der Top-Level-Klassifizierer ordnet im ersten Schritt die Daten in Gram-positiv oder Gram-negativ ein. Die Daten wurden hierbei auf Basis einer SVM mit radialem Kernel mit einer Genauigkeit von 99,5 % richtig klassifiziert. In einem zweiten Schritt werden die Spektren einer Gattung zugewiesen, bevor sie im dritten Schritt zudem auf Spezies-Ebene, bzw. im Falle von *E. coli* auf Stamm-Ebene diskriminiert werden. Alle Knotenpunkte werden durch die Anwendung einer SVM realisiert.

Der „Gram+“-Klassifizierer konnte 97,2 % der gemessenen 1.648 Raman-Spektren der *Listeria* spp. und *Staphylococcus* spp. richtig zuordnen. Im Gegenzug wurden 92,8 % der 2.974 Spektren mit dem „Gram“-Klassifizierer korrekt als *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* oder *Yersinia* erkannt.

### **Validierung des Modellsystems mit „unbekannten“ Proben**

Die Validierung des Modellsystems erfolgte mit zwölf unabhängigen Identifizierungsproben: Davon waren sechs Proben Pathogene, die auf Blutagar kultiviert wurden, drei Proben bestanden aus mit Bakterien versetzten Rinderhackproben und wiederum drei aus künstlich kontaminierten Hühnerbrustproben. Eine Übersicht der Identifizierungsproben ist in Tabelle 1 [SM4] integriert.

Die auf Agar angezogenen Identifizierungsproben wurden für die Beurteilung der generellen Fähigkeit des Basismodells zur Differenzierung von Bakterienproben herangezogen. Die Proben wurden deshalb entsprechend der Trainingsdaten präpariert und analysiert.

Die kommerziell erhältlichen, vakuumverpackten Fleisch- und Geflügelproben wurden zunächst portioniert. Jeweils 2 g des Fleisches wurden für eine Analyse herangezogen und mit 1 ml ( $\sim 10^7$  Zellen/ml, auf Blutagar für 24 h bei 37 °C kultiviert) bakterieller Lösung versetzt. Die Proben wurden zunächst für weitere 24 h im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, um den Erregern eine Adaption an die Matrix zu ermöglichen und die Einhaltung der Kühlkette zu gewährleisten. Somit wurden Proben nahe industrieller Realbedingungen generiert, die eine starke Vermehrung der Keime und ein fortschreitenden Verderb der Probe eindämmen.

Anschließend wurden die Mikroben aus den Fleischstücken isoliert. Hierfür wurden 5 ml destilliertes Wasser auf die Probe gegeben und für 10 min in einem Rotator geschüttelt. Der dabei entstandene Fleischsaft wurde entnommen und filtriert. Ein steriler 5 µl-Filter wurde verwendet, um möglichst viele fleischliche Komponenten

abzutrennen. Letztlich wurde mit dem Zweck der Konzentrierung und Reinigung der Bakterien das Filtrat mehrfach zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 1 ml destilliertem Wasser resuspendiert. 1 µl der Lösung wurde auf Nickelfolie aufgebracht und an der Luft getrocknet, bevor die Raman-spektroskopischen Untersuchungen starteten.

Die Validierung eines Klassifizierungsmodells mit den Testdaten liefert wichtige Informationen über dessen Stabilität und gibt zudem Auskunft über das Potenzial, Realproben zu identifizieren.

Alle Spektren durchliefen vollständig die drei Stufen des Klassifizierungssystems. Dementsprechend erfolgte eine Zuordnung zu Gram-positiv oder Gram-negativ, bevor den Spektren zuerst eine Gattung und anschließend eine Spezies zugeordnet wurde. Alle Entscheidungen erfolgten dabei probenweise, d. h. die Klasse, welcher die Mehrheit der Spektren einer Probe zugeordnet wurde, wurde als Klasse für die gesamte Probe definiert. In Tabelle 2 [SM4] sind die Resultate zusammengestellt.

Mit 99,2 % konnten die Spektren der zwölf Proben (#1 bis #12) richtig, ihres taxonomischen Hintergrunds entsprechend, als Gram-positiv oder Gram-negativ identifiziert werden. Dabei wurden alle Testsamples, bis auf Probe #4 (91,1 %), fehlerfrei kategorisiert. Die Proben #1, #2, #5, #6, #7, #8, #11 und #12 wurden demnach Gram-negativen Bakterien zugeordnet, wobei die Proben #3, #4, #9, #10 als Gram-positiv erkannt wurden.

Im zweiten Schritt wurden die Proben einer Gattung zugeordnet. Das Ergebnis für die zwölf Proben ist in Abbildung 4 [SM4] grafisch erfasst. Für alle Proben konnte mit einer Mehrheit von mindestens 73,5 % (#11, *Yersinia*) die korrekte Gattung bestimmt werden. Die Proben #3 (*Listeria*, BA), #5 (*Pseudomonas*, BA), #6 (*Pseudomonas*, Beef), #7 (*Salmonella*, BA) wurden darüber hinaus mit einer Genauigkeit von 100 % detektiert.

Der Erfolg der vorangegangenen Klassifizierungen zur Identifizierung der Proben auf Gattungsebene mit einer Gesamtgenauigkeit von 81,7 % deutet daraufhin, dass weder das adaptierte Isolierungsverfahren noch die ursprüngliche Matrix der Keime einen Einfluss auf die Identifizierungsgenauigkeit haben.

Aus diesem Grund wurde eine Identifizierung auf Spezies-Level angestrebt. Alle zwölf Testproben wurden auf Basis einer entsprechend optimierten SVM analysiert. Die Proben #1 (*E. coli* DSMZ 10806); #2 (*E. coli* DSMZ 10806); #3 (*L. monocytogenes*); #4

(*L. monocytogenes*); #7 (*S. typhimurium*); #8 (*S. typhimurium*) und #10 (*S. aureus*) konnten mit einer Genauigkeit von 100 % identifiziert werden. Die Spezies-Zuordnungen der anderen Proben ergaben sich wie folgt: #5 *P. aeruginosa* (14,0 %); #6 *P. aeruginosa* (25,0 %); #9 *S. aureus* (89,9 %); #11 *Y. enterocolitica* (97,1 %) und #12 *Y. enterocolitica* (97,8 %).

Somit konnten zehn der zwölf Testproben zufriedenstellend auf Art-Ebene bzw. auf Stamm-Ebene identifiziert werden. Lediglich die Determinierung der beiden *P. aeruginosa*-Proben war auf Spezies-Level nicht erfolgreich. Die hohe Biodiversität der Gattung *Pseudomonas*, sowie die hohe metabolische Vielfältigkeit der Spezies selbst könnten das Raman-spektroskopische Ergebnis beeinflusst haben. Hinweise auf Fluktuationen zeigten sich bereits in dem hohen SDM-Wert (0.18) für die Spektren von *P. aeruginosa*. Für nachfolgende Studien sollte die Untersuchung weiterer *P. aeruginosa* Stämme und die Erweiterung der analysierten Kultivierungsparameter in Betracht gezogen werden.

Dennoch wird in dieser *Proof-of-principle* Studie gezeigt, dass die Analyse von Raman-Spektren mit ausgereiften chemometrischen Algorithmen eine vielversprechende Methode ist, schnell und präzise, Fleischkontaminationen zu detektieren.

## 1.5 Resümee

Die Lebensmitteldiagnostik verlangt nach einer Analysemethode, welche innerhalb eines knappen Zeitrahmens, schnell, akkurat und unbedenklich mit hohen Sensitivitäten Resultate liefert. Mit dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von Raman-Mikrospektroskopie in Kombination mit einer ausgereiften statistischen Datenanalyse das Potenzial aufzeigt, Lebensmittelkontaminationen im Rahmen der Anforderungen zu detektieren und bereits etablierte Methoden so sinnvoll zu ergänzen.

Im Vordergrund der Arbeit stand die Generierung von Klassifizierungsmodellen durch die Erarbeitung spektraler Datenbanken, welche ermöglichen sollten, „unbekannte“ Proben sicher zu identifizieren.

In diesem Zusammenhang wurde ein zweistufiges Modell aus circa 11.000 Raman-Spektren von 66 *Bacillus*-Stämmen und weiteren nah verwandten Spezies zur Detektion von Endosporen entwickelt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Analyse der 18 *Bacillus anthracis*- und 6 *Bacillus cereus*-Stämme gelegt, welche im Hinblick auf die Thematik Lebensmittelsicherheit hochrelevant sind. Die Validierung des Systems erfolgte mit 27 unabhängigen Proben, welche alle auf Art-Ebene selbst dann identifiziert werden konnten, wenn die betreffenden Stämme nicht teil der Datenbank waren. Bei der anschließenden Detektion von acht kontaminierten Umweltproben, u. a. Milchpulver und Salz, konnte die Stabilität des Systems gegenüber Realproben demonstriert werden [SM1].

Da Raman-mikrospektroskopische Untersuchungen die Analyse von Einzelzellen ermöglichen, wird ein zeitaufwendiger Vorkultivierungsschritt zur Anreicherung der Erreger obsolet. Dennoch ist die Konzentration und Aufarbeitung der Keime aus den meist komplexen Matrices, wie Milch oder Fleisch, besonders bei geringen Zellzahlen ein kritischer Faktor. Deswegen wurden Isolierungsverfahren hinsichtlich ihrer Raman-Kompatibilität analysiert. Die Anwendung einer Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Percoll als Gradientenmedium hat sich nicht nur für die Isolierung von Milchkeimen als effizient erwiesen, sondern kann vielmehr für eine Vielzahl von Medien, wie Fleisch oder Haushaltspulver, eingesetzt werden. Die Raman-spektroskopische Detektion wird dabei nicht behindert [SM2].



Die Detektion von pathogenen Kontaminationen in Lebensmitteln, wie Milch, Fleisch und deren zahlreichen Nebenprodukte, welche als Hauptnahrungsmittel der westlichen Welt gelten, ist ein entscheidender Aspekt in der Lebensmittelindustrie, um die Haltbarkeit und Genießbarkeit der Nahrungsmittel zu gewährleisten.

Deshalb wurden einige wichtige Vertreter pathogener lebensmittelassoziierter Keime Raman-spektroskopisch untersucht: Aus kontaminierten Milchproben isolierte *Brucella*-Spezies konnten klar von genetisch nah verwandten und schwer differenzierbaren Gattungen, wie *Ochrobactrum* und *Yersinia*, aber auch von anderen Milchkeimen, wie *Escherichia coli* und *Pseudomonas* spp. unterschieden werden [SM3]. Zudem konnten nach Erstellen eines dreistufigen Klassifizierungsmodells und unter Berücksichtigung verschiedener Kultivierungsmedien mit Fleischbestandteilen aus kontaminierten Fleisch- und Geflügelproben isolierte, pathogene *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* und *Y. enterocolitica* auf Art-Ebene identifiziert werden [SM4].

Zusammenfassend zeigten sich die erstellten Klassifizierungsmodelle auch dann stabil, wenn es darum ging, unabhängige Batches, unbekannte Stämme und Bakterien aus unbekannten Matrices zu detektieren.

Daraus impliziert sich, dass eine Raman-Mikrospektroskopische Identifizierung von Lebensmittelkeimen dann gewährleistet ist, wenn neben einem geeigneten Isolierungs- und Inaktivierungsprotokoll, Referenzspektren der zu analysierenden, taxonomisch ähnlichen Spezies und geeignete Klassifizierungsalgorithmen in einer zugrunde liegenden Datenbank berücksichtigt werden [SM1, SM2, SM3, SM4]. Eine Analyse kann dann von der Probennahme zumeist innerhalb weniger Stunden erfolgen. Die Möglichkeit mehrere Keime in einem Durchlauf zu erfassen (*Multiplexing*) ist dadurch gewährleistet, dass Raman-Mikrospektroskopie die Detektion einzelner Zellen ermöglicht.

Die Übertragung der *Proof-of-principle* Konzepte auf Vor-Ort-Analysen in der Lebensmittelindustrie zeigen sich in der Möglichkeit, den Raman-Mikroskopie-Ablauf zu automatisieren und den Aufbau auf eine kompakte Größe zu verkleinern. Darüber hinaus zeigt sich hierin auch das Potenzial, andere medizinische Fragestellungen zu beantworten.

---

## Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization (WHO). *Water, Sanitation and Hygiene Links to Health*. Facts and figures updated November 2004. 2004. [cited 2013 Apr 05]; Available from:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/facts2004/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/facts2004/en/).
- [2] Velusamy, V., et al., *An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors*. Biotechnology Advances, 2010. **28**(2): p. 232-254.
- [3] Morris, J.G., Jr., *How Safe Is Our Food?* Emerging Infectious Diseases, 2011. **17**(1): p. 126-128.
- [4] Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States*. Emerging Infectious Diseases, 1999. **5**(5): p. 607-625.
- [5] Ehiri, J.E., et al., *Implementation of HACCP in food businesses: The way ahead*. Food Control, 1995. **6**(6): p. 341-345.
- [6] Ammon, A., et al., *Lebensmittelinfektionen in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2000. **43**: p. 751-757.
- [7] Lynch, M.F., et al., *The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities*. Epidemiology and Infection, 2009. **137**(3): p. 307-315.
- [8] Newell, D.G., et al., *Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge*. International Journal of Food Microbiology, 2010. **139**: p. S3-S15.
- [9] Henson, S. and J. Caswell, *Food safety regulation: an overview of contemporary issues*. Food Policy, 1999. **24**(6): p. 589-603.
- [10] Bari, M.L., et al., *Behavior of Yersinia enterocolitica in Foods*. Journal of Pathogens, 2011. **2011**: p. 1-13.

- [11] Fosse, J., et al., *Prevalence and Risk Factors for Bacterial Food-Borne Zoonotic Hazards in Slaughter Pigs: A Review*. Zoonoses and Public Health, 2009. **56**(8): p. 429-454.
- [12] Oliver, S.P., et al., *Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications*. Foodborne Pathogens and Disease, 2005. **2**(2): p. 115-129.
- [13] Krause, G., et al., *The 2011 HUS epidemic in Germany. Challenges for disease control: what should be improved?* Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2013. **56**(1): p. 56-66.
- [14] Anderson, B., et al., *Microorganisms and bioterrorism*. 2006: Springer Science & Business Media, Incorporated.
- [15] Doganay, G.D. and M. Doganay, *Brucella as a potential agent of bioterrorism*. Recent patents on anti-infective drug discovery, 2013. **8**(1): p. 27-33.
- [16] Roda, A., et al., *Recent developments in rapid multiplexed bioanalytical methods for foodborne pathogenic bacteria detection*. Microchimica Acta, 2012. **178**(1-2): p. 7-28.
- [17] Troutt, H.F. and B.I. Osburn, *Meat from dairy cows: possible microbiological hazards and risks*. Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties, 1997. **16**(2): p. 405-414.
- [18] Tschäpe, H., *Lebensmittelbedingte Infektionskrankheiten durch Bakterien*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2000. **43**(10): p. 758-769.
- [19] Papagrigorakis, M.J., et al., *DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens*. International Journal of Infectious Diseases, 2006. **10**(3): p. 206-214.
- [20] Satin, M., *Food Alert!: The Ultimate Sourcebook for Food Safety*. 2008: Facts On File, Incorporated.
- [21] Satin, M., *Death in the Pot: The Impact of Food Poisoning on History*. 2007: Prometheus Books.
- [22] Jay, J.M., et al., *Modern Food Microbiology*. 2005: Springer.
- [23] Granum, P.E. and T. Lund, *Bacillus cereus and its food poisoning toxins*. FEMS Microbiology Letters, 1997. **157**(2): p. 223-228.

- [24] Ehling-Schulz, M., et al., *Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness*. Molecular Nutrition & Food Research, 2004. **48**(7): p. 479-487.
- [25] Shinagawa, K., *Analytical methods for Bacillus-cereus and other Bacillus species*. International Journal of Food Microbiology, 1990. **10**(2): p. 125-142.
- [26] Bhunia, A., *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. 2010: Springer.
- [27] Goji, N., et al., *A New Generation Microarray for the Simultaneous Detection and Identification of Yersinia pestis and Bacillus anthracis in Food*. Journal of pathogens, 2012. **2012**: p. 627036-627036.
- [28] Erickson, M.C. and J.L. Kornacki, *Bacillus anthracis: Current knowledge in relation to contamination of food*. Journal of Food Protection, 2003. **66**(4): p. 691-699.
- [29] Mukhopadhyay, S., et al., *Removal of Bacillus anthracis Sterne spore from commercial unpasteurized liquid egg white using cross-flow microfiltration*. Journal of Food Processing and Preservation, 2011. **35**(4): p. 550-562.
- [30] Pappas, G., et al., *The new global map of human brucellosis*. Lancet Infectious Diseases, 2006. **6**(2): p. 91-99.
- [31] Falenski, A., et al., *Survival of Brucella spp. in mineral water, milk and yogurt*. International Journal of Food Microbiology, 2011. **145**(1): p. 326-330.
- [32] Cutler, S.J., et al., *Brucellosis - new aspects of an old disease*. Journal of Applied Microbiology, 2005. **98**(6): p. 1270-1281.
- [33] Corbel, M.J., *Brucellosis: An overview*. Emerging Infectious Diseases, 1997. **3**(2): p. 213-221.
- [34] Corbel, M.J., *Recent advances in brucellosis*. Journal of Medical Microbiology, 1997. **46**(2): p. 101-103.
- [35] Mendez Martinez, C., et al., *Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalusia (Spain), January - March 2002*. Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, 2003. **8**(7): p. 164-8.
- [36] Karagiannis, I., et al., *Outbreak investigation of brucellosis in Thassos, Greece, 2008*. Eurosurveillance, 2012. **17**(11): p. 13-16.

- [37] Luna-Martinez, J.E. and C. Mejia-Teran, *Brucellosis in Mexico: current status and trends*. Veterinary Microbiology, 2002. **90**(1-4): p. 19-30.
- [38] McDermott, J.J. and S.M. Arimi, *Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact*. Veterinary Microbiology, 2002. **90**(1-4): p. 111-134.
- [39] Memish, Z.A. and H.H. Balkhy, *Brucellosis and international travel*. Journal of Travel Medicine, 2004. **11**(1): p. 49-55.
- [40] Yagupsky, P. and E.J. Baron, *Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism*. Emerging Infectious Diseases, 2005. **11**(8): p. 1180-1185.
- [41] Garcia, A., et al., *Zoonotic Enterohemorrhagic Escherichia coli: A One Health Perspective*. Ilar Journal, 2010. **51**(3): p. 221-232.
- [42] Ferens, W.A. and C.J. Hovde, *Escherichia coli O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection*. Foodborne Pathogens and Disease, 2011. **8**(4): p. 465-487.
- [43] Frank, C., et al., *Epidemic Profile of Shiga-Toxin-Producing Escherichia coli O104:H4 Outbreak in Germany*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(19): p. 1771-1780.
- [44] World Health Organization (WHO). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)*. Fact Sheet N° 125. Dec 2011. [cited 2013 Apr 04]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>.
- [45] Gandhi, M. and M.L. Chikindas, *Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **113**(1): p. 1-15.
- [46] Dogan, B. and K.J. Boor, *Genetic diversity and spoilage potentials among Pseudomonas spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 130-138.
- [47] Palleroni, N.J., *Pseudomonas classification - a new case-history in the taxonomy of Gram-negative bacteria*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology, 1993. **64**(3-4): p. 231-251.
- [48] Franzetti, L. and M. Scarpellini, *Characterisation of Pseudomonas spp. isolated from foods*. Annals of Microbiology, 2007. **57**(1): p. 39-47.
- [49] Ridgway, H.F., et al., *Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(11): p. 3565-3575.

- [50] Morais, P.V., et al., *Investigation of persistent colonization by Pseudomonas aeruginosa-like strains in a spring water bottling plant*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(3): p. 851-856.
- [51] Arnaut-Rollier, I., et al., *Identities of the Pseudomonas spp. in flora from chilled chicken*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **48**(2): p. 87-96.
- [52] Arnaut-Rollier, I., et al., *A numerical taxonomic study of the Pseudomonas flora isolated from poultry meat*. Journal of Applied Microbiology, 1999. **87**(1): p. 15-28.
- [53] Nguyenthe, C. and F. Carlin, *The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994. **34**(4): p. 371-401.
- [54] Riva, M., et al., *Microbiological quality and shelf life modeling of ready-to-eat cicorino*. Journal of Food Protection, 2001. **64**(2): p. 228-234.
- [55] Franzetti, L., et al., *Influence of active packaging on the shelf-life of minimally processed fish products in a modified atmosphere*. Packaging Technology and Science, 2001. **14**(6): p. 267-274.
- [56] Gram, L. and H.H. Huss, *Microbiological spoilage of fish and fish products*. International Journal of Food Microbiology, 1996. **33**(1): p. 121-137.
- [57] Shah, N.P., *Psychrotrophs in milk - A review*. Milchwissenschaft-Milk Science International, 1994. **49**(8): p. 432-437.
- [58] Wiedmann, M., et al., *Molecular and phenotypic characterization of Pseudomonas spp. isolated from milk*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(5): p. 2085-2095.
- [59] Davis, R., et al., *Detection and differentiation of live and heat-treated Salmonella enterica serovars inoculated onto chicken breast using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy*. Journal of Applied Microbiology, 2010. **109**(6): p. 2019-2031.
- [60] Sanchez-Vargas, F.M., et al., *Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention*. Travel Medicine and Infectious Disease, 2011. **9**(6): p. 263-277.
- [61] Schröder, C.M., et al., *Overview and summary of the food safety and inspection service risk assessment for Salmonella enteritidis in shell eggs, October 2005*. Foodborne Pathogens and Disease, 2006. **3**(4): p. 403-412.

- 
- [62] Heo, S.-K., et al., *Inactivation of Salmonella enterica serovar Typhimurium in Commercial Mayonnaise at Different Temperatures and pH*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010. **53**(3): p. 351-355.
- [63] Hohmann, E.L., *Nontyphoidal salmonellosis*. Clinical Infectious Diseases, 2001. **32**(2): p. 263-269.
- [64] Krause, G., et al., *Outbreak of Salmonella serotype Anatum infection associated with unpasteurized orange juice*. Southern Medical Journal, 2001. **94**(12): p. 1168-1172.
- [65] Alvarez-Ordóñez, A., et al., *Salmonella spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract*. Microbiology-Sgm, 2011. **157**: p. 3268-3281.
- [66] Le Loir, Y., et al., *Staphylococcus aureus and food poisoning*. Genetics and molecular research : GMR, 2003. **2**(1): p. 63-76.
- [67] Angeles Argudin, M., et al., *Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins*. Toxins, 2010. **2**(7): p. 1751-U342.
- [68] Peres, A.G. and J. Madrenas, *The broad landscape of immune interactions with Staphylococcus aureus: From commensalism to lethal infections*. Burns : journal of the International Society for Burn Injuries, 2013. **39**(3): p. 380-8.
- [69] Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: overview and epidemiologic correlates*. Microbes and Infection, 1999. **1**(4): p. 323-333.
- [70] Fredriksson-Ahomaa, M., et al., *Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections*. Fems Immunology and Medical Microbiology, 2006. **47**(3): p. 315-329.
- [71] Bottone, E.J., *Yersinia enterocolitica: The charisma continues*. Clinical Microbiology Reviews, 1997. **10**(2): p. 257-276.
- [72] Wang, X., et al., *Distribution of pathogenic Yersinia enterocolitica in China*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2009. **28**(10): p. 1237-1244.
- [73] Amoako, K.K., et al., *Development of Multitarget Real-Time PCR for the Rapid, Specific, and Sensitive Detection of Yersinia pestis in Milk and Ground Beef*. Journal of Food Protection, 2010. **73**(1): p. 18-25.
- [74] Garrido, A., et al., *A new multiplex real-time PCR developed method for Salmonella spp. and Listeria monocytogenes detection in food and environmental samples*. Food Control, 2013. **30**(1): p. 76-85.
-

- [75] Hudson, J.A., et al., *Detection, isolation and enumeration of Yersinia enterocolitica from raw pork*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **123**(1-2): p. 25-31.
- [76] Kawasaki, S., et al., *Evaluation of a Multiplex PCR System for Simultaneous Detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Escherichia coli O157:H7 in Foods and in Food Subjected to Freezing*. Foodborne Pathogens and Disease, 2009. **6**(1): p. 81-89.
- [77] Kim, J.S., et al., *A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: Escherichia coli O157 : H7, Salmonella, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, and Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Food Protection, 2007. **70**(7): p. 1656-1662.
- [78] Wang, L. and A. Mustapha, *EMA-Real-Time PCR as a Reliable Method for Detection of Viable Salmonella in Chicken and Eggs*. Journal of Food Science, 2010. **75**(3): p. M134-M139.
- [79] Yuan, Y., et al., *Universal Primer-Multiplex PCR Approach for Simultaneous Detection of Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella spp. in Food Samples*. Journal of Food Science, 2009. **74**(8): p. M446-M452.
- [80] Byrne, B., et al., *Antibody-Based Sensors: Principles, Problems and Potential for Detection of Pathogens and Associated Toxins*. Sensors, 2009. **9**(6): p. 4407-4445.
- [81] Zhao, Y., et al., *Simultaneous Detection of Multifood-Borne Pathogenic Bacteria Based on Functionalized Quantum Dots Coupled with Immunomagnetic Separation in Food Samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(2): p. 517-524.
- [82] Shields, M.J., et al., *Immunomagnetic Capture of Bacillus anthracis Spores from Food*. Journal of Food Protection, 2012. **75**(7): p. 1243-1248.
- [83] Ohk, S.-H. and A.K. Bhunia, *Multiplex fiber optic biosensor for detection of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica from ready-to-eat meat samples*. Food Microbiology, 2013. **33**(2): p. 166-171.
- [84] Nicolaou, N., et al., *Detection and Quantification of Bacterial Spoilage in Milk and Pork Meat Using MALDI-TOF-MS and Multivariate Analysis*. Analytical Chemistry, 2012. **84**(14): p. 5951-5958.
- [85] Böhme, K., et al., *Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from Italian dairy products by MALDI-TOF mass fingerprinting*. Electrophoresis, 2012. **33**(15): p. 2355-2364.



- 
- [86] Kiehntopf, M., et al., *Differentiation of Campylobacter Species by Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Foodborne Pathogens and Disease, 2011. **8**(8): p. 875-885.
- [87] Tsilia, V., et al., *Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the Bacillus cereus group*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **404**(6-7): p. 1691-1702.
- [88] Zhu, J. and J.E. Hill, *Detection of Escherichia coli via VOC profiling using secondary electrospray ionization-mass spectrometry (SESI-MS)*. Food microbiology, 2013. **34**(2): p. 412-7.
- [89] Alexandrakis, D., et al., *Detection and identification of bacteria in an isolated system with near-infrared spectroscopy and multivariate analysis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(10): p. 3431-3437.
- [90] Amamcharla, J.K., et al., *Application of vapour-phase Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and statistical feature selection methods for identifying Salmonella enterica typhimurium contamination in beef*. Biosystems Engineering, 2010. **107**(1): p. 1-9.
- [91] Ammor, M.S., et al., *Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics*. Meat Science, 2009. **81**(3): p. 507-514.
- [92] Argyri, A.A., et al., *Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2010. **145**(1): p. 146-154.
- [93] Ellis, D.I., et al., *Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning*. Analytica Chimica Acta, 2004. **514**(2): p. 193-201.
- [94] Nugen, S.R. and A.J. Baeumner, *Trends and opportunities in food pathogen detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(2): p. 451-454.
- [95] Oliver, J.D., *Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria*. FEMS Microbiology Reviews, 2010. **34**(4): p. 415-425.
- [96] Rossen, L., et al., *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*. International Journal of Food Microbiology, 1992. **17**(1): p. 37-45.
- [97] Zeng, X., et al., *Recombinant antibodies and their use in biosensors*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **402**(10): p. 3027-3038.
-

- [98] Raz, S.R. and W. Haasnoot, *Multiplex bioanalytical methods for food and environmental monitoring*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2011. **30**(9): p. 1526-1537.
- [99] Demirev, P.A. and C. Fenselau, *Mass Spectrometry for Rapid Characterization of Microorganisms*, in *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2008. p. 71-93.
- [100] Ellis, D.I., et al., *Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination*. Chemical Society Reviews, 2012. **41**(17): p. 5706-5727.
- [101] Mouwen, D.J.M., et al., *Applying Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics to the characterization and identification of lactic acid bacteria*. Vibrational Spectroscopy, 2011. **56**(2): p. 193-201.
- [102] Raman, C.V. and K.S. Krishnan, *A New Type of Secondary Radiation*. Nature, 1928. **121**(3048): p. 501-502.
- [103] Raman, C.V., *A Change of Wave-length in Light Scattering*. Nature, 1928. **121**(3051): p. 619-619.
- [104] Raman, C.V. and K.S. Krishnan, *Polarisation of Scattered Light-quanta*. Nature, 1928. **122**(3066): p. 169-169.
- [105] Maquelin, K., et al., *Vibrational Spectroscopic Studies of Microorganisms*, in *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. 2006, John Wiley & Sons, Ltd.
- [106] Schmitt, M. and J. Popp, *Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century*. Journal of Raman Spectroscopy, 2006. **37**(1-3): p. 20-28.
- [107] Harz, A., et al., *Vibrational Spectroscopy-A Powerful Tool for the Rapid Identification of Microbial Cells at the Single-Cell Level*. Cytometry Part A, 2009. **75A**(2): p. 104-113.
- [108] Petry, R., et al., *Raman Spectroscopy - A prospective tool in the life sciences*. Chemphyschem, 2003. **4**(1): p. 14-30.
- [109] Chalmers, J.M. and P.R. Griffiths, *Handbook of vibrational spectroscopy*. 2002: J. Wiley.
- [110] Atkins, P.W., et al., *Physikalische Chemie: 4. Auflage*. 2006: Wiley-VCH Verlag GmbH.
- [111] Schweitzer-Stenner, R., *Structure and dynamics of biomolecules probed by Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2005. **36**(4): p. 276-278.

- [112] Adar, F., et al., *Resonance Raman-Spectra of cytochromes-C and cytochromes-B in Paracoccus-denitrificans membranes - Evidence for heme-heme interactions*. Biochemistry, 1981. **20**(26): p. 7528-7531.
- [113] Paetzold, R., et al., *In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy*. Journal of Microbiological Methods, 2008. **72**(3): p. 241-248.
- [114] Tarcea, N., et al., *UV Raman spectroscopy - A technique for biological and mineralogical in situ planetary studies*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2007. **68**(4): p. 1029-1035.
- [115] Nelson, W.H., *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. 1991: VCH.
- [116] Hermelink, A., et al., *Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy*. Analyst, 2009. **134**(6): p. 1149-1153.
- [117] Walter, A., et al., *From Bulk to Single-Cell Classification of the Filamentous Growing Streptomyces Bacteria by Means of Raman Spectroscopy*. Applied Spectroscopy, 2011. **65**(10): p. 1116-1125.
- [118] Manoharan, R., et al., *UV Resonance Raman-spectra of bacteria, bacterial-spores, protoplasts and calcium dipicolinate*. Journal of Microbiological Methods, 1990. **11**(1): p. 1-15.
- [119] Gaus, K., et al., *Classification of lactic acid bacteria with UV-resonance Raman spectroscopy*. Biopolymers, 2006. **82**(4): p. 286-290.
- [120] Lopez-Diez, E.C. and R. Goodacre, *Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics*. Analytical Chemistry, 2004. **76**(3): p. 585-591.
- [121] Dalterio, R.A., et al., *An ultraviolet (242 nm excitation) Resonance Raman-study of live bacteria and bacterial components*. Applied Spectroscopy, 1987. **41**(3): p. 417-422.
- [122] Rösch, P., et al., *On-line monitoring and identification of bioaerosols*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(7): p. 2163-2170.
- [123] Hering, K., et al., *SERS: a versatile tool in chemical and biochemical diagnostics*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **390**(1): p. 113-124.

- [124] Patel, I.S., et al., *Barcoding bacterial cells: a SERS-based methodology for pathogen identification*. Journal of Raman Spectroscopy, 2008. **39**(11): p. 1660-1672.
- [125] Cowcher, D.P., et al., *Portable, quantitative detection of bacillus bacterial spores using surface-enhanced Raman scattering*. Analytical chemistry, 2013. **85**(6): p. 3297-302.
- [126] Grow, A.E., et al., *New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins*. Journal of Microbiological Methods, 2003. **53**(2): p. 221-233.
- [127] Jarvis, R.M. and R. Goodacre, *Characterisation and identification of bacteria using SERS*. Chemical Society Reviews, 2008. **37**(5): p. 931-936.
- [128] Walter, A., et al., *Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device*. Lab on a Chip, 2011. **11**: p. 1013-1021.
- [129] Fan, C., et al., *Rapid detection of food- and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011. **92**(5): p. 1053-1061.
- [130] Guicheteau, J., et al., *Bacillus spore classification via surface-enhanced Raman spectroscopy and principal component analysis*. Applied Spectroscopy, 2008. **62**(3): p. 267-272.
- [131] Puppels, G.J., et al., *Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy*. Nature, 1990. **347**(6290): p. 301-303.
- [132] Harz, M., et al., *Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus Staphylococcus and dependence on their cultivation conditions*. Analyst, 2005. **130**(11): p. 1543-1550.
- [133] Walter, A., et al., *Raman spectroscopic detection of Nickel impact on single Streptomyces cells - possible bioindicators for heavy metal contamination*. Journal of Raman Spectroscopy, 2012. **43**(8): p. 1058-1064.
- [134] Walter, A., et al., *Raman spectroscopic detection of physiology changes in plasmid-bearing Escherichia coli with and without antibiotic treatment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(9): p. 2763-2773.
- [135] Stöckel, S., et al., *Effect of supplementary manganese on the sporulation of Bacillus endospores analysed by Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2009. **40**(11): p. 1469-1477.

- [136] Krause, M., et al., *The investigation of single bacteria by means of fluorescence staining and Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2007. **38**(4): p. 369-372.
- [137] Krause, M., et al., *Localizing and Identifying Living Bacteria in an Abiotic Environment by a Combination of Raman and Fluorescence Microscopy*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(22): p. 8568-8575.
- [138] Harz, M., et al., *Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy*. Journal of Biophotonics, 2009. **2**(1-2): p. 70-80.
- [139] Pirttijarvi, T.S.M., et al., *Properties of Bacillus cereus and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes*. International Journal of Food Microbiology, 2000. **60**(2-3): p. 231-239.
- [140] Setlow, P., *Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals*. Journal of Applied Microbiology, 2006. **101**(3): p. 514-525.
- [141] Stöckel, S., et al., *Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(9): p. 2895-2907.
- [142] Bocklitz, T., et al., *How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models?* Analytica Chimica Acta, 2011. **704**(1-2): p. 47-56.
- [143] R. Development-Core-Team, *R: A language and environment for statistical computing*, 2008, R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
- [144] Stoeckel, S., et al., *Effect of supplementary manganese on the sporulation of Bacillus endospores analysed by Raman spectroscopy*. Journal of Raman Spectroscopy, 2009. **40**(11): p. 1469-1477.
- [145] Stoeckel, S., et al., *Raman Spectroscopy-Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(9): p. 2895-2907.
- [146] Stöckel, S., et al., *Raman Spectroscopic Detection of Anthrax Endospores in Powder Samples*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(22): p. 5339-5342.
- [147] Fukushima, H., et al., *Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(1): p. 92-100.

- [148] Pertoft, H., *Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2000. **44**(1-2): p. 1-30.
- [149] Gunasekera, T.S., et al., *A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(3): p. 1228-1232.
- [150] Smith, E.M., et al., *Savinase is a bactericidal enzyme*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 719-720.
- [151] Gunasekera, T.S. and D.A. Veal, *Savinase is a bactericidal enzyme - Reply*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(1): p. 720-721.
- [152] Yu, W.L. and K. Nielsen, *Review of Detection of Brucella spp. by Polymerase Chain Reaction*. Croatian Medical Journal, 2010. **51**(4): p. 306-313.
- [153] Ferreira, L., et al., *Identification of Brucella by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures*. Plos One, 2010. **5**(12).
  
- [SM1] Stöckel, S., S. Meisel, et al. *Identification of Bacillus anthracis via Raman spectroscopy and chemometric approaches*. Analytical Chemistry, 2012, **84**, p. 9873-9880.
  
- [SM2] Meisel, S., et al. *Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy*. Analyst, 2011, **136**(23), p. 4997-5005.
  
- [SM3] Meisel, S., et al. *Raman spectroscopy as potential tool to detect Brucella from milk*. Applied and Environmental Microbiology, 2012, **78**, p. 5575-5583.
  
- [SM4] Meisel, S., et al. *Identification of meat-associated pathogens via Raman micro-spectroscopy*. Food Microbiology, 2014, **38**, p. 36-43.

---

## **Kapitel 2**

### **Veröffentlichungen**

Im Folgenden sind die Nachdrucke der Publikationen zusammengefasst, die für die vorliegende Dissertation berücksichtigt wurden. Die entsprechenden Urheberrechte sind jeweils auf den einzelnen Deckblättern angegeben.





## 2.1 Identification of *B. anthracis* via Raman spectroscopy and chemometric approaches

[SM1]

Stephan Stöckel\*: Kultivierung und Aufarbeitung von Mikroorganismen  
Raman-mikrospektroskopische Messungen  
Datenanalyse und -auswertung  
Manuskripterstellung

Susann Meisel\*: Kultivierung und Aufarbeitung von Mikroorganismen  
Raman-mikrospektroskopische Messungen  
Datenanalyse  
Beiträge zum Manuskript

Mandy Elschner: Bereitstellung von Mikroorganismen und Messproben  
Konzept- und Ergebnisdiskussion  
Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Petra Rösch: Konzept- und Ergebnisdiskussion  
Revision und Überarbeitung des Manuskripts

Jürgen Popp: Projektleitung  
Konzept- und Ergebnisdiskussion  
Revision und Überarbeitung des Manuskripts

*Analytical Chemistry* **2012**, 84, 9873-9880

Der folgende Nachdruck dieser Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung  
von *American Chemical Society*.

---

\* Koautoren

# Identification of *Bacillus anthracis* via Raman Spectroscopy and Chemometric Approaches

S. Stöckel,<sup>†,‡</sup> S. Meisel,<sup>†,‡</sup> M. Elschner,<sup>§</sup> P. Rösch,<sup>\*,†</sup> and J. Popp<sup>†,||</sup>

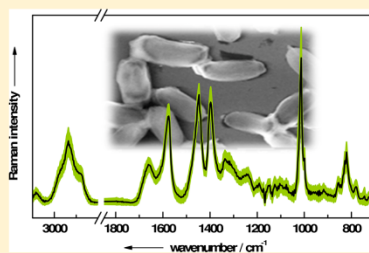
<sup>†</sup>Institute of Physical Chemistry and Abbe School of Photonics, Friedrich Schiller University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena, Germany

<sup>§</sup>Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena, Germany

<sup>||</sup>Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena, Germany

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Raman micro-spectroscopy was applied to compile a large-scale database of Raman spectra of single *Bacillus* endospores and to calculate classification functions, which were trained to discriminate between endospores of 66 strains from 13 *Bacillus* and *Bacillus*-related species including *B. anthracis*. The developed two-stage classification system comprising two support vector machines and one linear discriminant analysis classifier was then challenged by a test set of 27 samples to simulate the case of a real-world-scenario, when "unknown samples" are to be identified. In the end, all 27 test set samples including six *B. anthracis* strains were identified correctly. The samples thereby covered a diverse selection of species within the phylogenetically broad *Bacillus* genus and also included strains, which were not incorporated in the database before. All of them were correctly identified on the species level with accuracies between 88 and 100%. The sample analysis itself requires no biomass enrichment step prior to the analysis and qualifies the presented Raman spectroscopic approach to be a rapid analysis system in term of *Bacillus* endospore typing.



*Bacillus* is a large genus of aerobic endospore-forming genera and comprises bacteria of an enormous breadth in physiological and genetic diversity. Several taxa are of outstanding scientific or societal importance as for example members of the so-called *B. cereus* group (CG). Today, six validly published species collectively compose the group: *B. anthracis*, a highly pathogenic risk group 3 species as causative agent of anthrax,<sup>1</sup> and *B. cereus*, a risk group 2 species best known for causing symptoms of vomiting or diarrhea in food poisonings.<sup>2</sup> Further members are *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, and *B. weihenstephanensis*. There are controversies concerning the taxonomy of this very group: While some authors suggest to include one more species (or subspecies),<sup>3</sup> others prefer to consider *B. anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis* as one single species due to very high DNA sequence similarities.<sup>4</sup> The equivocal taxonomic interrelationship of these species makes a rapid discrimination difficult, although various detection methods have been developed, and many more are in the development phase. The main workhorses are still conventional microbiological methods, where a phenotypic differentiation especially of *B. cereus* group members in environmental samples is difficult.<sup>5</sup> Additionally, they tend to be most labor intensive and often require 1–2 days of testing. They have to be performed by well-trained and certificated personal under restrictive Biological Safety Level 3 (BSL 3) containment environments. And most of the so-called typical reactions are

culture dependent and/or plasmid coded. Strains with characteristics of *B. cereus* have been isolated from animals with clinical anthrax.<sup>6</sup> Other studies showed that only 85% of *B. anthracis* strains were phage-sensitive, and a few nonanthrax strains underwent phage-lysis.<sup>7</sup>

Second in line of the *B. anthracis* detection systems are a battery of nucleic-acid based assays, which are also challenged by a number of pitfalls. Endospores have been reported as difficult to process because their nucleic acid is encased in a very resistant shell.<sup>8</sup> The 16S rRNA sequence analysis is of no avail for *B. cereus* group members, since their sequences are almost identical: A 100% sequence identity between *B. anthracis* and *B. cereus* was reported, and a difference of only 4–9 nucleotides from the sequences of *B. mycoides* and *B. thuringiensis* was found.<sup>9</sup> The strategy to detect sequences on the *B. anthracis* virulence plasmids pXO1 and pXO2 falls short in the case of *B. anthracis* strains lacking either one or both of these genome segments or non-*B. anthracis* strains that acquired those plasmids via horizontal gene transfer.<sup>6</sup> Most of these amplification methods therefore have to rely on both a chromosomal marker and a marker on one of the virulence plasmids.<sup>10</sup> Other molecular methods like amplified fragment

Received: August 6, 2012

Accepted: October 25, 2012

Published: October 26, 2012

## Analytical Chemistry

## Article

length polymorphism analysis (AFLP) or variable number tandem repeats analysis (VNTR) achieved very high levels of resolution even for strain identification of *B. anthracis*, but these methods are designed to work on isolated colonies and hence are unlikely to achieve relevant identification of *B. anthracis* on field.<sup>11</sup> A general drawback of PCR-based methods is the need for a clean starting sample due to the method's liability to a myriad of inhibitory substances.<sup>12</sup> An application for real-time biodection of environmental samples is therefore limited, since a precultivation is still mandatory.

Antibody-based tests use conjugated monoclonal and polydonal antibodies induced against *B. anthracis*. However, many of them have shown cross-reactivity with CG-members and their production is often difficult.<sup>13</sup> A further limitation is the relatively high detection limit compared to other techniques,<sup>14</sup> which also is not a supportive for a convenient, rapid, and real-time detection of *B. anthracis*.

Modern analytical technologies based on mass spectrometry follow a strategy after which specific biomarker signatures of bacteria, like patterns of proteins, carbohydrates, or fatty acids, are registered. This makes a microbial identification by a pattern-matching algorithm with the help of chemometrics possible. For example, extensive work has been done to elaborate discriminating spectral features between different *Bacillus* species relying on protein patterns.<sup>15,16</sup> However, a successful application of mass spectroscopy-based techniques still requires a cultivation phase under rigorous conditions and, apart from intact-cell mass spectroscopy (ICMS), work steps to release and derivatize biomarkers from the cells into components, which are amenable to the analysis.

The joint concept of microscopy and Raman spectroscopy (Raman micro-spectroscopy) with visible light excitation allows probing of bacteria at single-cell level and thus makes biomass enrichment steps prior to analysis redundant.<sup>17</sup> It is also possible to identify bacteria by matching experimental spectral Raman fingerprints of single bacteria with reference members of the same biological species in preformed spectral databases. This pattern-matching approach was applied in medical, food-processing, or military fields to sense a various number of different pathogenic micro-organisms.<sup>18–20</sup> Even several in-depth studies concerning the Raman-spectroscopic characterization of *Bacillus* endospores have already been performed,<sup>21–23</sup> including an assay to sense endospores in complex matrices like baking powder or sand.<sup>24</sup> Especially the latter publication exemplifies the robustness of Raman micro-spectroscopy in dealing with environmental samples, in which the sensitivity for PCR-based detection systems is deteriorated due to attenuating and inhibitory effects of matrix constituents. This is all the more important, since nucleic acid amplification-based techniques are strongly adapted to the target agents by the chosen set of primers, e.g., amplifying sequences on both of the *B. anthracis*-specific virulence plasmids pXO1 and pXO2 allows solely the detection of (virulent) *B. anthracis*. However, a Raman-spectroscopic approach represents a multiplex sensing system when combined with a comprehensively armed spectral database, i.e., containing reference Raman spectra of a wide range of *Bacillus* and *Bacillus*-related species. All species, of which end-member spectra are registered in that database, can then be simultaneously identified. Out of this reason, we compiled a large database of single-endospore Raman spectra to cover a broader fraction of the genotypic diversity among the *Bacillus* genus and related genera and employed it in combination with statistical analytical methods to identify not

only samples of *B. anthracis* but also other more or less closely related *Bacillus* species, e.g., the food contaminant *B. cereus* or harmless soil saprophytes like *B. pumilus* or *B. subtilis*. To achieve this, we also developed a multistep classification scheme with two types of supervised classifiers: linear discriminant analysis (LDA) and support vector machines (SVM).

## MATERIALS AND METHODS

**Species and Strains Used.** An overview of the *Bacillus*, *Geobacillus*, and *Paenibacillus* species and strains used throughout this study is provided in Table 1. Most of the nonpathogenic strains were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH, Braunschweig, Germany, whereas all pathogenic and a few nonpathogenic *Bacillus* strains were provided by the Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany.

**Sample Preparation and Inactivation.** To account for biological variability, at least two independently cultivated batches of each *Bacillus* strain were prepared. Thus, suspensions of each *Bacillus* species with concentrations around  $10^7$  spores per milliliter were produced via two different methods: One method was the cultivation on nutrient agar (NA) plates at 30 °C. The medium is formulated as follows: 5.0 g of peptone, 3.0 g of meat extract, 0.04 g of  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 15 g of agar, and 1000 mL of distilled water (pH  $7.0 \pm 0.2$ , autoclaved at 121 °C, 20 min). The bacteria were rinsed off the plates after seven days of cultivation and washed three times by centrifugation for 2 min at 12 100g (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg) and resuspension in distilled water (pH  $7.0 \pm 0.2$ , autoclaved at 121 °C, 20 min). For the other cultivation approach, bacteria were inoculated into Tryptone-Glucose-Broth (TGB) consisting of 2.5 g of yeast extract, 5.0 g of trypton, and 1.0 g of glucose per 1000 mL of distilled water (pH  $7.2 \pm 0.2$ , autoclaved at 121 °C, 20 min). After incubation at 37 °C for 3 d, 1 mL of the TGB was inoculated on yeast extract agar consisting of 10.0 g of peptone, 2.0 g of yeast extract, 0.04 g of  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , and 15 g of agar per 1000 mL distilled water (pH  $7.0 \pm 0.2$ , autoclaved at 121 °C, 20 min). After incubation at 37 °C for 9 days, the spores were harvested by washing with 5 mL of distilled water and centrifugation at 2218g for 10 min (Heraeus Biofuge Primo R, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The sediment was washed four times using distilled water before the suspension was heated at 75 °C for 10 min. Formaldehyde (1.5 mL of 20% solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) was applied to the endospore pellets, which were acquired after centrifugation of the prepared suspensions to inactivate the potentially pathogenic endospores.<sup>25</sup> The samples were rotated continuously (VWR tube rotator, VWR, Leuven, Belgium) during the time of treatment of one hour until the process was stopped by centrifugation with 12 100g (MiniSpin, Eppendorf, Hamburg, Germany) for one minute. The final suspensions were stored at 4 °C until further processing.

**Spectroscopic Instrumentation.** All of the Raman spectra were collected under ambient conditions. The Raman spectroscopic measurements were carried out with a micro-Raman device (BioParticleExplorer, rap.ID Particle Systems GmbH, Berlin, Germany) that allows automated measurements of single-cell Raman spectra with an excitation light of 532 nm from a solid-state frequency-doubled Nd:YAG module (LCM-S-111-NNP25, Laser-export Co. Ltd.). An Olympus MPLFLN 100XBD objective focused the Raman excitation light onto the sample with a spot size of  $<1 \mu\text{m}$  laterally so that approximately 7 mW hit the sample. The integration time per Raman

9874

dx.doi.org/10.1021/acs.302250t | Anal. Chem. 2012, 84, 9873–9880

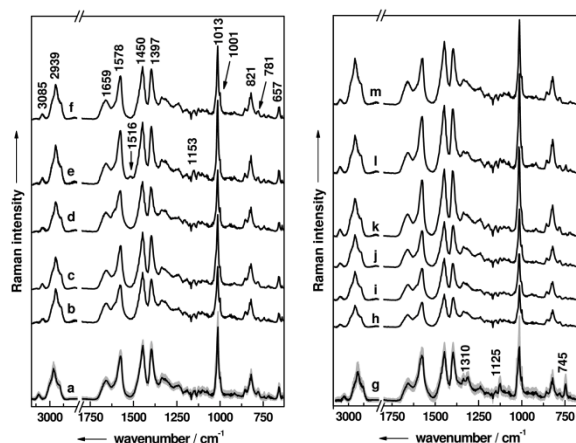
Table 1. *Bacillus* Strains, Abbreviations, Number of Raman Spectra in the Database, and Standard Deviation of the Means (SDM) per Species

species	abbr	strains <sup>a</sup>	no. spectra	SDM
<i>B. anthracis</i> (18)	Bant	13/38, 19/37, 19/39, 19/57, 25/70, 53/59, 527, 4463, 5261, B11/38, B22/39, UD III- <sup>b</sup> , A58, Ames A93, Vollum <sup>c</sup> , 03-1640, 03-1641 <sup>d</sup> , Sterne <sup>e</sup>	2227	0.14
<i>B. atropineas</i> (3)	Batr	DSM 675, DSM 2277, DSM 5551	817	0.19
<i>B. cereus</i> (6)	Beer	DSM 31 <sup>f</sup> , DSM 345, DSM 487, DSM 626, DSM 4490, DSM 6791	796	0.17
<i>B. licheniformis</i>	Blic	DSM 13	201	0.15
<i>B. megaterium</i> (2)	Bmeg	DSM 32, DSM 90	315	0.19
<i>B. myoides</i> (3)	Bmyc	DSM 299, DSM 307, DSM 2048	691	0.15
<i>B. pumilus</i> (7)	Bpum	DSM 354, DSM 361, DSM 492, DSM 766, DSM 1794 <sup>f</sup> , DSM 2893, DSM 13855	832	0.18
<i>B. spizizenii</i> (4)	Bspiz	DSM 28, DSM 488, DSM 1867, DSM 2899 <sup>f</sup>	407	0.21
<i>B. subtilis</i> (8)	Bsub	DSM 10, DSM 347, DSM 618, DSM 704, DSM 1091 <sup>f</sup> , DSM 2109, DSM 6399, DSM 6405	1010	0.20
<i>B. thuringiensis</i> (6)	Bthu	DSM 330, DSM 2046, DSM 5725, DSM 5815, DSM 6070, DSM 6890 <sup>f</sup>	1023	0.17
<i>B. weihenstephanensis</i> (9)	Bwei	WSBC 10067, WSBC 10206, WSBC 10289, WSBC 10379, WSBC 10389, WSBC 10396, WSBC 10415, WSBC 10550, WSBC 10690 <sup>f</sup>	1326	0.13
<i>G. kaustophilus</i>	Geob	DSM 7263	206	0.14
<i>G. stearothermophilus</i> (2)	Geob	DSM 22, DSM 297	412	0.14
<i>P. polymyxa</i> (3)	Ppol	DSM 36, DSM 256, DSM 740	496	0.14

<sup>a</sup>*B. anthracis* strain collection of Friedrich Loeffler Institut, Jena – originating in detail from the following: <sup>b</sup>Federal Institute for Risk Assessment, Berlin, Germany. <sup>c</sup>University of Hohenheim, Stuttgart, Germany. <sup>d</sup>Robert Koch-Institut, Wernigerode, Germany. <sup>e</sup>EQAdBa-Repository, Robert Koch-Institut, Berlin, Germany. <sup>f</sup>All marked strains were not included in the database but taken as validation samples to be identified by the classifiers. DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany; WSBC, Weihenstephan *Bacillus* collection, Institute of Microbiology, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, Germany.

spectrum (–113 to 3186 cm<sup>–1</sup>) was five seconds after a photobleaching period of one second to mitigate spectral contributions because of fluorescence, though it was already of minor extent in most of the endospore spectra. After removal of the Rayleigh scattering via two edge filters, the 180° backscattered Raman light was diffracted with a single-stage monochromator (HE 532, Horiba Jobin Yvon) with a 920 lines/mm grating and collected with a thermoelectrically cooled charge-coupled device camera (DV401-BV, Andor Technology) with a spectral resolution of ca. 7 cm<sup>–1</sup>. For single-cell measurements, one spectrum of each cell was recorded after 2.5 s and one after 5 s. These two were afterward compared for spike removal.

**Multivariate Analysis.** Gnu R was used for the statistical analyses.<sup>26</sup> The procedure mainly consisted of three steps: preprocessing, training of the self-learning machines to build a model, and validation. The preprocessing of every data set was always the same. First, the background of the spectra and cosmic spikes were removed. The background was stripped off by employing a statistics-sensitive nonlinear iterative peak-clipping algorithm (SNIP), which is in principle a composite of a low statistics filter and a peak-clipping algorithm.<sup>27</sup> A fourth-order algorithm was applied with a clipping window of seven to generate an individual background for each spectrum, which then is subtracted from the corresponding original spectrum. Because of their origin, the cosmic spikes are neither correlated in time nor in space and could therefore be localized by recording two Raman spectra of the same endospore. Intensity differences for each channel and their standard deviation were calculated and spikes located in channels, where the intensity difference exceeded twice the standard deviation. The spectra afterward underwent a wavenumber calibration with acetaminophen as standard<sup>28</sup> before a cut off took place: For the calculation the wavenumber regions 639–1802 cm<sup>–1</sup> and 2783–3186 cm<sup>–1</sup> were used. A further preprocessing step was normalization: A spectrum was divided by its area, which was calculated as the Euclidean distance of the spectrum to the zero spectrum. Optionally, a principal component analysis (PCA) was performed to reduce the dimensionality of the problem and to remove white noise.<sup>29</sup> After a particular channel the scores were cut off in the new spectral space. The number of chosen scores correlates with the size of the data set, but a good choice is to use not more than 5% of the number of spectra to avoid overfitting.<sup>30</sup> New sets of spectra were always preprocessed the same way. To convert two sets in the same spectral space we did not perform a PCA with the combined data set but rather rotated the new set by the loadings of the PCA of the first data set into the spectral space of the first data set. For the unsupervised hierarchical cluster analysis (squared Euclidean distance and Ward algorithm), only the first 5 scores of the PCA were considered. We chose a LDA and SVM as supervised classifiers to evaluate the spectral data sets.<sup>31,32</sup> For the LDA, only the first 21 scores of a PCA went into the calculation, whereas no PCA was performed in advance of a SVM. 10-fold cross-validation was used to validate the classifiers and determine the optimal kernel parameters of the employed radial basis kernel in case of the SVM via grid search. The resulting accuracy was taken as accuracy of the classification model. An estimation of the generalization error was done by means of a hold-out technique: Sets of endospores from all the analyzed *Bacillus* species were used for training, other completely independent batches of the same strains, which were separately cultured, were used as identification set



**Figure 1.** Mean Raman spectra of each of the analyzed *Bacillus* species: (a) *B. anthracis* (calculated from 2227 single endospore Raman spectra, double standard deviation depicted as gray corona), (b) *B. atrophaceus* (817 spectra), (c) *B. cereus* (796 spectra), (d) *B. licheniformis* (201 spectra), (e) *B. megaterium* (315 spectra), (f) *B. mycoides* (691 spectra), (g) *B. sphaericus* (407 spectra, double standard deviation depicted as gray corona), (h) *B. pumilus* (832 spectra), (i) *B. subtilis* (1010 spectra), (j) *B. thuringiensis* (1023 spectra), (k) *B. weihenstephanensis* (1326 spectra), (l) *Geobacillus* spp. (618 spectra), (m) *P. polymyxa* (496 spectra).

(validation set). In doing so, an application of the procedure under realistic conditions was simulated and its accuracy assessed.

## RESULTS AND DISCUSSION

Mean Raman spectra from analyzed *Bacillus* and *Bacillus*-related species are displayed in Figure 1. They were obtained by averaging preprocessed single-cell Raman spectra and are presented to give a species-wise overview of the typical signal patterns in endospore Raman spectra. The most dominant Raman signals in all of the spectra are attributable to the calcium chelate of pyridine-2,6-dicarboxylic acid (calcium dipicolinate, CaDPA). This endospore-specific substance is largely deposited in the endospore's core (ca. 5–15% of the spore dry weight) and is responsible for the low water content in the core giving the endospores their remarkable heat resistance.<sup>33</sup> The observed bands can basically be divided in two groups according to their origin: Skeletal vibrations of the pyridine ring (657, 1013, 1450, and 3085  $\text{cm}^{-1}$ ) and vibrational modes due to the carboxylate group (821, 1397, and 1578  $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>34</sup> Band positions and relative intensities of these signals vary only slightly between the spectra in Figure 1, and since CaDPA is ubiquitously present in all *Bacillus* endospores, these bands taken alone are not diagnostic beyond indicating the general presence of endospores. Thus, also signals of other biopolymers in the bacteria need to be taken into account, such as the ring vibrations of cytosine/uracil at 781  $\text{cm}^{-1}$ , the 1001- $\text{cm}^{-1}$  band of the ring breathing vibration of phenylalanine, or the 1659- $\text{cm}^{-1}$  biomarker for the amid I mode.<sup>21</sup> Not all bands arise exclusively due to one single class of molecules but are rather superpositions of several types of biomolecules. This can be seen, e.g., at the aforementioned band at 821  $\text{cm}^{-1}$ , where the tyrosine ring breathing mode overlaps with a  $\text{COO}^-$  signal of CaDPA. Another example is

the  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  deformation mode of proteins and lipids at 1450  $\text{cm}^{-1}$  supplemented by the CaDPA pyridine ring vibration. Also 1578  $\text{cm}^{-1}$  is made up by ring vibrations of guanine and adenine combined with the asymmetric carboxylate vibration. Finally, the prominent C–H band in the high-wavenumber region at 2939  $\text{cm}^{-1}$  is a generic marker for almost all types of biopolymers in bacteria bearing carbon and hydrogen. Upon closer inspection, some signals unique for certain *Bacillus* species can be located. The inconspicuous bands at 1153 and 1516  $\text{cm}^{-1}$  are exclusive features of the *B. megaterium* spectrum (Figure 1e) and are normally typical hallmarks of carotenoids. Indeed, strains of *B. megaterium* were found to express several pigments, most probably as safeguard mechanisms against UV radiation.<sup>35</sup> Another, in this case *B. sphaericus*-specific, signal pattern (Figure 1g) is clearly evident in form of the band triplet at 745, 1125, and 1310  $\text{cm}^{-1}$ , which presumably originates from heme-bearing proteins such as cytochromes.<sup>36</sup> It is obvious that the mean spectra of different species share a tremendous similarity with each other, and no unique features strike out as possible marker bands for a certain species. Bare-eyed discrimination of the average spectra (and the single-cell Raman spectra behind them as well) in Figure 1 is therefore a futile endeavor. A more promising way to dig out the miniscule interspecies differences is by interpreting the whole spectrum in a multivariate way as spectral fingerprint. An in-depth and exhaustive knowledge of each of the signals in the Raman signatures is not mandatory in these pattern-matching approaches, nonetheless the whole information is considered in the data evaluation. However, an important premise to do so is a sufficient reproducibility of the spectra within the species, although the spectra of one species stem from different strains and batches from two different laboratories and were measured on different days by different operators. After preprocessing, the treated spectra have to be analyzed for inherent variations due to the fact that single cells are measured: Unavoidable

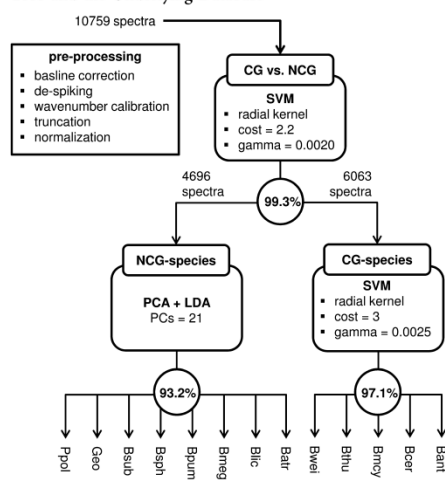


fluctuations in the biochemical makeup from cell to cell in one batch cause spectral variations.<sup>37</sup> To compare the species among each other, a normalized standard deviation is calculated for each species. The mean of the standard deviation per channel is normalized to the standard deviation of the channel means resulting in a standard deviation of the means (SDM).<sup>38</sup> Thus, the standard deviation per channel is put into relation of a mean spectrum's statistical property. The SDM values for each species are given in the rightmost column of Table 1, where low SDM numbers represent low channel-wise variabilities and thus high reproducibility and reliability of the data set. High numbers in the range of nearly 1 would stand for high volatilities per channel and would cast doubt on the data's reliability. All calculated SDMs are significantly lower than 1 in a tight interval between 0.14 to 0.21. *B. anthracis* spectra (SDM 0.14) sticks out by a very high homogeneity only topped by *B. weihenstephanensis* (SDM 0.13), whereas *B. sphaericus* has the highest SDM of 0.21. To identify the underlying spectral variations, the distribution of all individual class spectra is depicted in Figure 1 by visualizing the double standard deviation per wavenumber for *B. anthracis* (a) and *B. sphaericus* (g) in the form of gray coronas surrounding the mean spectra: Spectral features remain widely constant in both cases in terms of signal locations and band intensities. Especially the ensemble of single *B. anthracis* spectra exhibits a remarkably high reproducibility with almost constant standard deviations for all wavenumbers. The situation however is slightly different for *B. sphaericus*, as specifically the bands of CaDPA bear a relatively high variance compared to other signals, which is readily identifiable at the 1016  $\text{cm}^{-1}$  peak. This is a reasonable outcome, as Huang et al. have already ascertained significant variations of CaDPA levels among single endospores of one species hypothesizing a size effect of single endospores between and in-between single strains.<sup>22</sup> We therefore built a database with more than 10 000 Raman signatures of single endospores (Table 1) to mirror the naturally occurring variations of CaDPA in individual cells as good as possible, so that any detrimental effects on the data mining operations described below are minimized.

The database consisted of single endospore Raman spectra from 13 species and 66 strains. In an attempt to structure this massive amount of data, a HCA was performed to organize the spectra according to interspectral similarities. Since this is a nonhypothesis technique, no particular attention to the underlying class structure was paid, and all 66 (*Geo*-, *Paeni*-) *Bacillus* strain average spectra were fed into the algorithm in an unbiased way. The resulting outcomes can help to structure and devise strategies for more sophisticated data evaluation approaches as outlined below, which also consider a priori class information. The dendrogram in Figure S1 of the Supporting Information depicts partitions that mirror well-expected relations known from taxonomic considerations: While block A almost exclusively contains the spectra of *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, and *B. weihenstephanensis* strains, block B pools together the spectra of all the other *Bacillus* species plus the two non-*Bacillus* species with the exception of two *B. thuringiensis* strains and one *B. cereus* strain, which are boldfaced in the dendrogram. The whole data set is apparently divided by the HCA into a *B. cereus* group (BC group) cluster A and non-*B. cereus* (NBC group) cluster B. This principle breakdown suggests an evident harmony between Raman spectroscopic fueled relationships and phylogenetic or taxonomic ones.

In the upcoming calculations we were trying to derive a benefit from this basic information by structuring the classification systems in two steps. The idea is to condition computer algorithms, which learn by example, to assign labels (*Bacillus* species) to objects (single-endospore Raman spectra) by modeling probabilities of class membership. The training ground for the classifier is a comprehensive compilation of bacterial reference Raman spectra, which ideally comprises end member spectra of all species that are to be identified. Thus, 10759 Raman spectra of single *Bacillus*, *Geobacillus*, and *Paenibacillus* endospores, broken down in species and strains in Table 1, represented the input or training data. Scheme 1

**Scheme 1. Structure and Parameters of the Classification Tree and the Underlying Database**



portrays the overall work flow for the data analysis. It shows not only the hierarchy in the training data set, but also the succession of decision steps of the classification and identification process. This decision tree was orientated on a spectral hierarchy in the data, as was worked out under the preceding paragraph. At the top level, a decision between species of the *B. cereus* group (CG) and non-*B. cereus* group (NCG) is done before at the second hierarchical level a subdivision into the respective species is carried out. We chose two elementary binary classifiers to perform the task at hand: LDA in combination with a PCA and SVM. Both were recently applied to discriminate bacteria and particles of inorganic origin according to their Raman spectra and demonstrated different suitability and application potentials.<sup>39,40</sup> Thus, a toolbox of not only differently operating classification algorithms but also of parameters thereof stand to the disposal to optimally design and fine-tune a classification system. All crucial parameters (type of kernel, kernel parameters cost and gamma, number of scores) were determined by optimizing each knot toward a maximum of predictive ability, determined via cross-validation and reduced reliability to overfitting. The final values for each knot are delivered in Scheme 1. Attempts to calculate a classifier, which was trained to discriminated all 13 species in

Table 2. Results of the Three Classifiers after Processing 27 Test Samples<sup>a</sup>

sample	class	strain	top level			species level			
			CG	NCG	assigned to	TP/all	sensitivity	classes of FP	assigned to
1	Bant	03–1641	70	0	CG	68/70	97.1%	Bthu (2)	Bant
2	Bant	19–57	73	0	CG	72/73	98.6%	Bcer (1)	Bant
3	Bant	S261	81	0	CG	81/81	100%		Bant
4	Bant	A58	72	0	CG	70/72	97.2%	Bcer (2)	Bant
5	Bant	Sterne	93	0	CG	90/93	96.8%	Bthu (2)	Bant
6*	Bant	Vollum	81	1	CG	80/82	97.6%	Bwei (1)	Bant
7	Batr	DSM 5551	0	145	NCG	145/145	100%	Bthu (2)	Batr
8	Bcer	DSM 487	89	0	CG	82/89	92.1%	Bant (7)	Bcer
9*	Bcer	DSM 31	77	1	CG	76/78	97.4%	Bant (2)	Bcer
10	Blic	DSM 13	0	119	NCG	116/119	97.5%	Batr (1)	Blic
								Bpum (1)	
								Bsub (1)	
11	Bmeg	DSM 90	13	83	NCG	95/96	99.0%	Bpol (1)	Bmeg
12	Bmyc	DSM 299	108	0	CG	103/108	95.4%	Bthu (4)	Bmyc
								Bcer (1)	
13	Bpum	DSM 354	0	71	NCG	70/71	98.6%	Batr (1)	Bpum
14	Bpum	DSM 361	1	66	NCG	67/67	100%		Bpum
15*	Bpum	DSM 1794	0	118	NCG	115/118	97.5%	Batr (3)	Bpum
16	Bsph	DSM 488	0	87	NCG	81/87	93.1%	Geo (6)	Bsph
17*	Bsph	DSM 2899	0	151	NCG	151/151	100%		Bsph
18	Bsub	DSM 6399	0	95	NCG	95/95	100%		Bsub
19*	Bsub	DSM 1091	1	188	NCG	184/189	97.4%	Batr (4)	Bsub
								Bpol (1)	
20	Bthu	DSM 2046	86	0	CG	76/86	88.4%	Bmyc (5)	Bthu
								Bwei (3)	
								Bant (2)	
21	Bthu	DSM 6070	75	0	CG	75/75	100%		Bthu
22*	Bthu	DSM 6890	201	0	CG	200/201	99.5%	Bwei (1)	Bthu
23	Bwei	WSBC 10389	96	0	CG	95/96	99.0%	Bmyc (1)	Bwei
24	Bwei	WSBC 10415	95	0	CG	93/95	97.9%	Bant (1)	Bwei
								Bmyc (1)	
25*	Bwei	WSBC 10690	168	0	CG	163/168	97.0%	Bant (3)	Bwei
								Bthu (2)	
26	Geo	DSM 22	0	131	NCG	130/131	99.2%	Bsub (1)	Geo
27	Bpol	DSM 740	1	117	NCG	118/118	100%		Bpol

<sup>a</sup>CG = *B. cereus* group, NCG = non-*B. cereus* group, TP = true positives, FP = false positives.

one step, were to no avail, as only an unsatisfactory generalization ability was obtained, although the cross-validation worked well (data not shown). Especially a discrimination of the BC members proved to be difficult.

The top-level classifier was a SVM, which was fed with all 10759 Raman spectra of the training set to learn to tell the difference between Raman spectra of CG and NCG species. The internal cross-validation determined the accuracy of this classifier to be 99.3%, i.e., 10 680 of 10 759 of the training set spectra were correctly assigned according to their CG or NCG affiliation. On the lower tier, a second SVM classifier made full use of all 6063 true CG spectra to be capable of discriminating between the five CG species *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, and *B. weihenstephanensis*. The classifier's performance was determined by cross-validation to 97.1%. The other second-layer classifier was an LDA optimized by training with 4696 Raman spectra of the eight NCG species *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Geobacillus* spp., and *P. polymyxa*. This time, the accuracy amounted for 93.2% (4377 of 4696 spectra were correctly classified).

Having the classification system at hand, it is now possible to ask the system about the class-membership of 27 "unknown" samples (1–27 as given in Table 2). These samples were prepared anew and completely independent from the samples produced for the model built-up but were processed and analyzed as all the samples before. By challenging the model with the Raman spectra of the 27 test samples, its generalization ability (or insusceptibility to overfitting) was assessed. Thereby, not only the predictive accuracy was measured but also the case simulated, when real-world samples are to be analyzed. To complicate the matter even more, we included in the test sets Raman spectra of strains (samples marked with asterisk), which had not been included in the model before. This was done for all the species with more than three different strains in the database: *B. anthracis* (test sample 6\*), *B. cereus* (9\*), *B. pumilus* (15\*), *B. sphaericus* (17\*), *B. subtilis* (19\*), *B. thuringiensis* (22\*), and *B. weihenstephanensis* (25\*). This gives an important estimation of the robustness of the system, as it is highly possible to encounter nondatabase strains of a specific species in real-world samples. Each spectrum of the 27 test samples was interrogated twice during the identification

process: First, it is determined whether the spectrum is from a CG or NCG endospore, thereafter to which species it belongs to. Both decisions are done sample wise, i.e., the class to which the majority of spectra is assigned to determines the class of the whole sample. The outcomes of the classifiers are presented in a somewhat condensed form in Table 2 and more detailed in the confusion tables of Tables S1 and S2 of the Supporting Information. The results of the top-level classifier can be found under the column "top-level" in Table 2, where all samples 1–27 were labeled as either CG or NCG. Correct diagnoses can be stated for all the 27 samples giving rise to an average accuracy of 99.4%. In 6 of 27 samples false negatives occurred, notably in sample 11 (*B. megaterium*) with 13 of 96 wrongly labeled spectra. The distribution of the samples in the end corresponds perfectly with the true sample-classes: Samples 1–6\*, 8, 9\*, 12, and 20–25\* were categorized as CG samples, while samples 7, 10, 11, 13–19\*, 26, and 27 were categorized to contain NCG endospores.

After the 27 validation samples passed the top-level classifier, they were evaluated by the respective species-determining classifiers. A sufficient discrimination of CG-endospores was only achieved by a SVM, which was explicitly trained to perform this very task (97.1% classification accuracy). The columns under "species-level" in Table 2 outline the outcomes: In the case of the 15 putative CG samples, a flawless performance was achieved, as all samples were identified correctly with accuracies in the range of 88.4% (sample 20, *B. thuringiensis*) to 100% (samples 3, *B. anthracis*, and 21, *B. thuringiensis*). Especially the diagnostic certainty for the six *B. anthracis* samples is comparatively high with only 10 false negatives among all 471 Raman spectra of this species plus 15 false positives coming from five different samples. Six of the *B. anthracis* spectra were misidentified as being *B. thuringiensis*, a tendency, which is to be expected, as it is advised to use this species as nonpathogenic surrogate for *B. anthracis*.<sup>41</sup> Even sample 6\* was identified correctly as *B. anthracis*, although it contained endospores of the Vollum strain, of which no reference spectra were incorporated in the database before; the same is true for the non-*B. anthracis* strains 9\* (*B. cereus*), 22\* (*B. thuringiensis*), and 25\* (*B. weihenstephanensis*). To summarize, the overall identification rate of this classifier can be calculated to 97.1% (1424 of 1467 spectra correctly labeled). The other second-layer NCG classifier—this time a less computational-intensive PCA/LDA approach—also perfectly assigned each of the 12 putative NCG-samples to the correct species. The identification accuracies per sample were in all but one case (16 *B. sphaericus* with 93.1% sensitivity) above 97% and 1367 of all 1387 Raman spectra that passed this classifier were put into the right class (98.6% sensitivity). The samples with strains new to the model (15\*, 17\*, and 19\*) were all assigned to the correct class, too, with sensitivities in the range of the other samples.

Inspired by these results, we challenged the 2-step classification system even further by testing Raman spectra of endospores, which were isolated out of spiked household powders.<sup>24</sup> Spectra of eight samples (P1–P8) of *B. anthracis* Sterne (isolated from common salt), *B. megaterium* DSM 90 (bird sand), *B. subtilis* DSM 10 (milk powder), and *B. thuringiensis* DSM 350 (baking powder) were labeled as Table S3 of the Supporting Information presents: The top-level classifier (97.8% accuracy) as well as both species classifiers (CG, 92.1%; NCG, 97.2%) performed sufficiently so that all eight samples were in the end identified correctly. A slight

tendency toward intermixing spectra of *B. anthracis* and *B. thuringiensis* is given again. All in all, the accuracy levels of the cross-validation were retained—or even slightly better in case of the NCG-LDA classifier—for all validation samples and a tendency toward overfitting was also not detectable. Therefore, all "unknown" samples were correctly identified without exception. This holds true even for *Bacillus* endospores extracted from real-world samples. Finally, the database strains obviously provide a generalization potential high enough to identify even strains new to the model.

## CONCLUSION

Within this work, we strived to show that Raman spectroscopy as a diagnostic tool for *Bacillus* endospores can complement already established techniques by compensating some of their weak spots. Above all, the independency of time-extensive biomass enrichment steps peaks out. Only 50–100 intact bacterial cells are required to deduce a diagnostic result for one sample—a number of micro-organisms that can be quickly extracted out of various kinds of environmental samples, when an appropriate isolation protocol is at hand. This is all the more true because inhibiting effects of the matrix, from which the endospores have to be extracted, play, if any, only a minor role. Another plus is the fact that the whole organism is probed, not only specific biomarkers like plasmidic gene. Consequently, the identification of *B. anthracis* with differing plasmid loadings posed not a problem in our study: Virulent strains with a full virulence plasmid setup like 03–1641 and 19–57 (samples 1 and 2) as well as nonvirulent pXO1-depleted (*B. anthracis* 5261, sample 3), pXO2-depleted (sample 5 Sterne) strains and also strains lacking both plasmids (*B. anthracis* A58) were correctly determined as being *B. anthracis*. A further merit of the herein described Raman spectroscopic approach is its general applicability in terms of discrimination of endospores throughout the whole *Bacillus* genus and related genera. No matter, whether pathogenic (for example *B. anthracis* or *B. cereus*), environmental (among them *B. pumilus* or *B. subtilis*), or industrially used endospores (e.g., *B. licheniformis*) are target organisms, an identification via Raman spectroscopy is always possible as long as reference-spectra of the respective taxon are incorporated in the database and considered by the classifier. We could also show that even *Bacillus* strains absent in the database can safely be identified on species level. Thus, also newly discovered strains from novel, often exotic, environments can be taken into account in the future. In the end, this allows an identification of multiple targets, which is beneficial in eliminating false-negative and false-positive results, especially in case of environmental samples with possible bacterial mixtures.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +49-3641-948381. Fax: +49-3641-948302. E-mail: [petra.rosch@uni-jena.de](mailto:petra.rosch@uni-jena.de).

### Author Contributions

<sup>†</sup>These authors contributed equally.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.



## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Funding of the research projects "Pathosafe" (FKZ 13N9547 and FKZ 13N9549) and "RamaDek" (FKZ 13N11168) from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF), "MikroPlex" (PE113-1) from the Thüringische Exzellenzinitiative (TMBWK), as well as funding of "EQADe-Ba" by the EU, EAHG Agreement No. 2007 204 is gratefully acknowledged. We also thank Matthias Frank and Katja Fischer (Friedrich Loeffler Institute, Germany) for doing the sample preparation and inactivation experiments.

## ■ REFERENCES

- (1) Mock, M.; Fouet, A. *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, *55*, 647–671.
- (2) Bottone, E. J. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23*, 382–398.
- (3) Jackson, P. J.; Hill, K. K.; Laker, M. T.; Ticknor, L. O.; Keim, P. J. *Appl. Microbiol.* **1999**, *87*, 263–269.
- (4) Helgason, E.; Okstad, O. A.; Caugant, D. A.; Johansen, H. A.; Fouet, A.; Mock, M.; Hegna, I.; Kolsto, A.-B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2627–2630.
- (5) Klee, S. R.; Nattermann, H.; Becker, S.; Urban-Schriever, M.; Franz, T.; Jacob, D.; Appel, B. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 673–681.
- (6) Klee, S. R.; Oezel, M.; Appel, B.; Boesch, C.; Ellerbrok, H.; Jacob, D.; Holland, G.; Leendertz, F. H.; Pauli, G.; Grunow, R.; Nattermann, H. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 5333–5344.
- (7) Schuch, R.; Nelson, D.; Fischetti, V. A. *Nature* **2002**, *418*, 884–889.
- (8) Belgrader, P.; Okuzumi, M.; Pourahmadi, F.; Borkholder, D. A.; Northrup, M. A. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *14*, 849–852.
- (9) Ash, C.; Farrow, J. A. E.; Dorsch, M.; Stackebrandt, E.; Collins, M. D. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, *41*, 343–346.
- (10) Hoffmaster, A. R.; Meyer, R. F.; Bowen, M. P.; Marston, C. K.; Weyant, R. S.; Barnett, G. A.; Sejvar, J. J.; Jernigan, J. A.; Perkins, B. A.; Popovic, T. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1178–1182.
- (11) Keim, P.; Pearson, T.; Okinaka, R. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 4791–4799.
- (12) Wilson, I. G. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 3741–3751.
- (13) Tamborini, M.; Oberli, M. A.; Werz, D. B.; Schurch, N.; Frey, J.; Seeburger, P. H.; Pluschke, G. *J. Appl. Microbiol.* **2009**, *106*, 1618–1628.
- (14) Rao, S. S.; Mohan, K. V. K.; Atreya, C. D. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *82*, 1–10.
- (15) Lasch, P.; Beyer, W.; Nattermann, H.; Stammler, M.; Siegbrecht, E.; Grunow, R.; Naumann, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7229–7242.
- (16) Callahan, C.; Fox, K.; Fox, A. *Mol. Cell. Probes* **2009**, *23*, 291–297.
- (17) Harz, M.; Rösch, P.; Popp, J. *Cytometry, Part A* **2009**, *75A*, 104–113.
- (18) Wulf, M. W. H.; Willemse-Erix, D.; Verduin, C. M.; Puppels, G.; van Belkum, A.; Maquelin, K. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 147–152.
- (19) Meisel, S.; Stöckel, S.; Elschner, M.; Melzer, F.; Rösch, P.; Popp, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5575–5583.
- (20) Tripathi, A.; Jabbour, R. E.; Treado, P. J.; Neiss, J. H.; Nelson, M. P.; Jensen, J. L.; Snyder, A. P. *Appl. Spectrosc.* **2008**, *62*, 1–9.
- (21) De Gelder, J.; Scheldeman, P.; Leus, K.; Heyndrickx, M.; Vandenaabeele, P.; Moens, L.; De Vos, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 2143–2151.
- (22) Huang, S. S.; Chen, D.; Pelczar, P. L.; Vepachedu, V. R.; Setlow, P.; Li, Y. Q. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 4681–4687.
- (23) Zhang, P.; Kong, L.; Wang, G.; Scotland, M.; Ghosh, S.; Setlow, B.; Setlow, P.; Li, Y. Q. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *112*, 526–536.
- (24) Stöckel, S.; Meisel, S.; Elschner, M.; Rösch, P.; Popp, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 5339–5342.
- (25) Stöckel, S.; Schumacher, W.; Meisel, S.; Elschner, M.; Rösch, P.; Popp, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 2895–2907.
- (26) R. Development Core Team. *R Foundation for Statistical Computing*; Vienna, Austria, 2008.
- (27) Morhac, M. *Nucl. Instrum. Methods A* **2009**, *600*, 478–487.
- (28) Carrabba, M. M. In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*; John Wiley & Sons, Ltd., 2006; Vol. 1.
- (29) Pearson, K. *Philos. Mag.* **1901**, *2*, 559–572.
- (30) Vapnik, V. N. *The Nature of Statistical Learning Theory*, 2nd ed.; Springer: New York, 2000.
- (31) Fisher, R. *Ann. Eugen.* **1936**, *7*, 179–188.
- (32) Burges, C. J. C. *Data Min. Knowl. Discovery* **1998**, *2*, 121–167.
- (33) Setlow, P. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *101*, S14–S25.
- (34) Carmona, P. *Spectrochim. Acta, Part A* **1980**, *36A*, 705–12.
- (35) Mitchell, C.; Iyer, S.; Skomurski, J. F.; Vary, J. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52*, 64–67.
- (36) Desbois, A. *Biochimie* **1994**, *76*, 693–707.
- (37) Hermelink, A.; Brauer, A.; Lasch, P.; Naumann, D. *Analyst* **2009**, *134*, 1149–1153.
- (38) Walter, A.; März, A.; Schumacher, W.; Rösch, P.; Popp, J. *Lab Chip* **2011**, *11*, 1013–1021.
- (39) Schumacher, W.; Kühnert, M.; Rösch, P.; Popp, J. *J. Raman Spectrosc.* **2011**, *42*, 383–392.
- (40) Meisel, S.; Stöckel, S.; Elschner, M.; Rösch, P.; Popp, J. *Analyst* **2011**, *136*, 4997–5005.
- (41) Greenberg, D. L.; Busch, J. D.; Keim, P.; Wagner, D. M. *Invest. Genet.* **2010**, *1*, 4.



## 2.2 Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy

[SM2]

Susann Meisel	Kultivierung und Aufarbeitung der Bakterien Anpassung der Extraktionsverfahren und Zellzahlbestimmung Raman-mikrospektroskopische Messungen Datenanalyse und -auswertung Erstellung des Manuskripts
Stephan Stöckel	Kultivierung und Aufarbeitung der Bakterien Datenanalyse und -auswertung Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Mandy Elschner	Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts

*Analyst* **2011**, 136, 4997–5005

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von  
*The Royal Society of Chemistry.*

Cite this: *Analyst*, 2011, **136**, 4997

www.rsc.org/analyst

PAPER

## Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy

Susann Meisel,<sup>a</sup> Stephan Stöckel,<sup>a</sup> Mandy Elschner,<sup>b</sup> Petra Rösch<sup>a</sup> and Jürgen Popp<sup>\*ac</sup>

Received 22nd August 2011, Accepted 14th September 2011

DOI: 10.1039/c1an15761b

The identification of single microorganism in food samples by conventional plating techniques or molecular genetic methods requires a time consuming enrichment step. Raman spectroscopy in combination with a suitable extraction method however offers the possibility to rapidly identify bacteria on a single cell level. Here we evaluate the two well-known bacteria extraction methods from milk: "buoyant density centrifugation" and "enzymatic milk clearing" towards their recovery efficiency and their compatibility with Raman spectroscopy for a rapid identification of microorganisms in milk. The achieved recovery yields are slightly better compared to those which are already applied for food investigations, where a loss of one order of magnitude is usually reached. For example, buoyant density centrifugation allows collecting up to 35% of the milk-spiked microorganisms. To prove the suitability of the isolation techniques for use in combination with the spectroscopic approach, a small Raman database has been created by recording Raman spectra of well-known contaminants in dairy products. Two subspecies of *Escherichia coli* and three different *Pseudomonas* species, which were inoculated to UHT (ultra-high-temperature processed) milk and afterwards extracted by the two techniques mentioned above, were analysed. At a first glance, grave spectral artefacts caused by the matrix itself or especially by the extraction techniques were not obvious. But *via* chemometric analysis, it could be shown that these factors noticeably influence the identification rates: while the samples prepared *via* milk clearing did not provide sufficient identification results, buoyant density centrifugation allows an identification of the investigated species with an overall accuracy of 91% in combination with linear discriminant analysis.

### Introduction

For a rapid identification procedure of microorganisms in complex matrices, a sample preparation step permitting the separation, concentration and detection of microorganisms directly out of complex matrices without the necessity of an enrichment step by cultivation is required. However, since it is very difficult to detect small numbers of pathogens in complex environments, even microbiologists refer to this problem as "finding a needle in a haystack".<sup>1</sup> In particular the food industry, where pathogenic contaminations can cause diseases with wide-ranging consequences for the economy and public health, would extremely benefit from a convincing solution of this challenging problem.

Especially the dairy industry is highly concerned with pathogenic contaminations, since milk is a complicated food matrix, providing an excellent culture medium for the growth and multiplication of many kinds of microorganisms.<sup>2</sup> It is known that milk contamination is caused by improperly cleaned filling machines and pasteurisers.<sup>3</sup> Since the introduction of refrigeration to extend the storage life of milk on its way from the farm to the consumer, especially psychotropic bacteria became an escalating problem for the dairy industry.<sup>4,5</sup> In this context it is reported that *Pseudomonas* spp. (especially *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*) as psychrotolerant organisms are known as important contaminants in conventionally pasteurized fluid milk products causing the majority of spoilage.<sup>3,4,6</sup> Furthermore Gras-Le Guen *et al.* pointed out that a contamination of milk bank pasteurisers can cause a food-borne *Pseudomonas aeruginosa* outbreak infecting consumers.<sup>7</sup> Two different ways are reported in the literature leading to the adverse effects caused by these species during the production chain:<sup>5,6,8</sup> *Pseudomonas* spp. produce the majority of lipolytic and proteolytic enzymes secreted into raw milk during pre-processing storage, which can survive pasteurization and even ultra-high-temperature treatment and cause a reduction of

<sup>a</sup>Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University Jena, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Germany. E-mail: juergen.popp@uni-jena.de; Fax: +493641/948302; Tel: +493641/948320

<sup>b</sup>Friedrich Loeffler Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Naumburger Straße 96a, D-07743 Jena, Germany

<sup>c</sup>Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, D-07745 Jena, Germany

[View Online](#)

shelf life. Also contaminations introduced after the pasteurization process contribute to the spoilage of conventionally pasteurized milk during refrigerated storage.

Due to its complex biochemical composition together with its high water content, milk serves as an excellent culture medium for the growth and multiplication of many kinds of microorganisms.<sup>2,5,9</sup> Besides *Pseudomonas*, *Escherichia coli* also is a frequently occurring contamination in milk,<sup>10,11</sup> which is a reliable indicator of faecal pollution mostly due to unsanitary conditions.<sup>2</sup> Therefore, the detection of *Pseudomonas* spp. and also *Escherichia coli* in milk is useful to track down the contamination sources and the hygienic status of dairy plants.

Thus, an identification of microbial contaminations on short timescales to minimize possible health hazards as well as production downtimes causing financial deficits is essential. However, conventional plating techniques, which are commonly applied in industry, are time-consuming and demanding with respect to media preparation and interpretation by experienced personnel. Over the years these plating techniques have been supplemented by other more sophisticated and sensitive methods including molecular genetic methods, like polymerase chain reaction (PCR),<sup>12</sup> or immunological approaches, like enzyme immunoassays,<sup>10</sup> as well as Fluorescence In Situ Hybridization (FISH).<sup>11</sup> However, all these techniques are cost-intensive and pre-cultivation is still necessary.

Vibrational spectroscopy in combination with statistical data analysis methods (chemometrics) is an appropriate tool for the rapid identification of microorganisms. It can do so because vibrational spectroscopy is non-destructive and achieves high molecular specificities *i.e.* yields molecular fingerprint information.<sup>13</sup> Infrared<sup>14–17</sup> and in particular micro-Raman spectroscopy have shown great capability to rapidly identify microorganisms like *e.g.* pathogens without the need for pure cultures or any cultivation step.<sup>18–20</sup> While the application of Vis or NIR Raman excitation wavelengths<sup>21,22</sup> allows for a phenotypic characterization, resonant excitation in the UV probes taxonomic markers<sup>23–25</sup> (*e.g.* DNA/RNA vibrations). As compared with UV excitation, NIR/Vis micro-Raman spectroscopy enables the identification of bacteria on a single cell level.<sup>18,19,26–29</sup> For the localization of single microorganisms embedded in complex matrices fluorescence staining of the microorganisms enables a differentiation between biotic and abiotic particles, before Raman spectroscopic identification is performed.<sup>30</sup> Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) can also be applied to detect single bacterial cells.<sup>31–36</sup> To the best of our knowledge, all of these publications do not deal with a compatible isolation of bacteria from complex matrices, which are a crucial requirement for spectroscopic analyses.

In order to fully exploit the potential of micro-Raman spectroscopy as a cultivation-free identification tool, following conditions have to be fulfilled: the matrix itself as well as the isolation procedure must not strongly affect the cells and thus their Raman signals, which might have a detrimental effect on the discriminatory power of the technique.

Methods to separate and concentrate single bacteria out of a food matrix include, amongst others, filtration, low speed centrifugation, high speed centrifugation or buoyant density centrifugation (BDC).<sup>1</sup> Especially BDC is well known for isolating bacteria in a gradient medium from food particles based on their different buoyant densities for PCR analyses.<sup>37,38</sup> The advantages of this sample preparation method are its easy and

fast handling, as well as the preservation of the cell viability, which allows an analysis of intact bacterial cells.<sup>12</sup> Furthermore, enzymatic procedures have also been reported to be useful for isolating microorganisms from food. In this context the enzyme Savinase is used to catalyse the hydrolysis of peptide bonds from milk proteins. Together with an additional centrifugation step, this technique can be applied to collect a bacterial pellet by removing the milk proteins and fat.<sup>4</sup>

In this study, we present the spiking of ultra-high-temperature processed (UHT) milk with well-known milk contaminants (*Pseudomonas* spp. and *E. coli*) to evaluate the two isolation methods BDC and milk clearing (MC) with the enzyme Savinase towards their compatibility with Raman spectroscopic studies. Herein, we focused on the achievable extraction yields as well as on the possibility to apply chemometrical methods on the Raman spectra of the extracted microbial species to identify them on a single cell level.

## Materials and methods

### Cultivation of bacteria

*Pseudomonas* (*P. fragi* DSM 3456, *P. putida* DSM 291, *P. stutzeri* DSM 5190) and two strains of *Escherichia coli* (*E. coli* DSM 423, *E. coli* DSM 501) were chosen to represent Gram-negative rods as potential contaminants in milk.

All strains were originally purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany).

All the microorganisms that were used were prepared on nutrient agar (NA) plates as overnight-culture. The medium was formulated as follows: 5.0 g peptone, 3.0 g meat extract, 15 g agar and 1000 ml distilled water. All cultures, except the culture of *Pseudomonas fragi* DSM 3456 (26 °C, 24 h) were incubated for 24 h at 37 °C. The microorganisms were suspended in 1 ml distilled water and cleaned up by centrifugation and resuspension in distilled water for three times. For every investigated species three independently cultivated samples were prepared under the same conditions to take biological variability between the samples into account.

### Microbial cell quantification

To determine the cell concentration, a standard microbiological plating technique was used. For this reason 100 µl of serially diluted cell suspensions of *E. coli* DSM 501 were applied to nutrient agar plates and incubated at 37 °C for one day. The resultant colonies were counted afterwards. The quantification was done twice for each suspension to ensure the reproducibility of the results.

To specify the recovery rate, the sample with the determined starting concentration of *E. coli* DSM 501 was diluted in milk to the desired end concentration. After isolation, all *E. coli* extracts were diluted in distilled water to quantify the recovered cells by means of viable cell counting.

### Sample preparation

Solely UHT (ultra high temperature-treated) milk with 1.5% fat content, which is commercially available in food stores, was used,

since Hayes *et al.* pointed out that there is no difference in growth rates of microorganisms between skimmed or whole milk when stored at 5 °C.<sup>3</sup> To ensure a germ-poor medium, the milk was used right after opening and fresh milk samples were spiked with the different bacterial strains by concentrations of about  $10^7$  cells  $\text{mL}^{-1}$  milk. The spiked milk samples were incubated overnight at 4 °C to avoid bacterial growth and then the bacteria were isolated as described below. The same procedure was adopted on spiked distilled water. For the Raman spectroscopic investigations 1  $\mu\text{L}$  of the extracted microbial suspension was placed on a nickel foil and air-dried.

#### Extraction techniques

**Buoyant density centrifugation (BDC).** This isolation technique is a combination of different buoyant density centrifugations using Percoll solutions with various densities as a rapid technique for separation and concentration of food-borne pathogens in food samples to quantify viable cells by PCR.<sup>1</sup> The density gradient medium Percoll (Biochrom AG, Easycoll Separating Solution, Berlin, Germany) consists of PVP (polyvinylpyrrolidone) covered sodium-stabilized silica colloidal particles<sup>39</sup> diluted in 0.15 M sodium chloride solution.

To apply this method in combination with Raman spectroscopy the following adapted protocol was applied:

500  $\mu\text{L}$  of the spiked milk samples were mixed with 1 mL of a Percoll solution (density:  $1.050 \text{ g mL}^{-1}$ ) and centrifuged at 4500g for 15 min at room temperature. This step is called flotation assay as a part of the buoyant density centrifugation to separate the pathogens from the milk matrix. After centrifugation, the supernatant including the milk matrix was carefully removed before continuing with the sedimentation assay.<sup>1</sup> Therefore, the leftover of the flotation assay containing the microorganisms and some milk particles with higher buoyant density was homogenized by vortexing and placed on top of two layers of Percoll solutions. The bottom layer consists of 600  $\mu\text{L}$  of  $1.123 \text{ g mL}^{-1}$  Percoll solution, while the upper layer consists of 600  $\mu\text{L}$  of  $1.050 \text{ g mL}^{-1}$  Percoll solution. This sample was centrifuged at 14 500g for 5 min to gather the bacteria in a layer, which was carefully removed (about 500  $\mu\text{L}$ ). This volume was put into a 1.5 mL microtube together with 1 mL of a 0.15 M sodium chloride solution to reduce the density of the separation solution and centrifuged again at 14 500g for 5 min at room temperature. The supernatant was removed and the pellet was suspended in 1 mL distilled water and cleaned from Percoll residues for three times by centrifugation at 3300g for 3 min, removing the supernatant and resuspended in distilled water.

**Milk clearing (MC).** Another method to isolate bacteria from milk involves an enzymatic procedure to remove milk fat and proteins and to isolate bacteria from milk using Savinase.<sup>4,40</sup> The enzyme Savinase 16.0L (Sigma, Hamburg, Germany) is a protease from *Bacillus* sp.

10  $\mu\text{L}$  of Savinase ( $\geq 16 \text{ U g}^{-1}$ ) was added to 100  $\mu\text{L}$  spiked milk and then incubated over a time period of approximately 45 min at 30 °C. Afterwards 900  $\mu\text{L}$  of 0.15 M sodium chloride was added to the sample and centrifuged at 10 000g and 22 °C for 5 min. Digested proteins and lipids in the top layer were removed with a micropipette. The remaining bacterial pellet was suspended in 1

mL distilled water and washed three times by centrifugation (3300g, 3 min).

#### Spectroscopic instrumentation

All micro-Raman spectroscopic measurements were performed with a commercially available Raman platform (Bio-ParticleExplorer, RapID, Berlin, Germany). The Raman spectra were measured with 532 nm generated by a solid-state frequency-doubled Nd:YAG diode-pumped laser (LCM-S-111-NNP25, Laser-export Co. Ltd., Moscow, Russia). Reflecting mirrors were used to deliver the excitation light to the sample probe by passing an Olympus MPLFLN 100 $\times$  BD objective. The incident laser power on the sample was approximately 3.5 mW. The scattered light was then focused on a single-stage monochromator (HE 532, Horiba Jobin Yvon, Munich, Germany) equipped with a 920 lines  $\text{mm}^{-1}$  grating and collected with a thermoelectrically cooled CCD camera (DV401-BV, Andor Technology, Belfast, Northern Ireland). The spectral resolution was about  $10 \text{ cm}^{-1}$ . Raman spectra were measured with an integration time of 20 s. From each batch, 30 spectra of single cells were collected. In summary, 90 spectra of each species were measured. Two batches were taken to create a classification model, whereas a third remaining batch was used for identification.

#### Multivariate analysis

Multivariate analyses were performed by using Gnu R.<sup>41,42</sup>

In the following, the chemometric approach to analyse the bacterial Raman spectra is briefly explained. The approach consists of three steps: pre-processing, training of the self-learning machine and validation.<sup>43–46</sup>

Each dataset was pre-processed in the same way in order to reduce the contribution from noise and also spectral variations due to the measuring procedure. First the cosmic spikes and the background of the spectra were removed. The latter is necessary because the spectral background can differ for different measurements of one particular substance, so it would disturb the training process of the self-learning machines. For this purpose the SNIP algorithm (Statistics-sensitive Nonlinear Iterative Peak-clipping algorithm), which is a composite of a low statistics filter and a peak clipping algorithm, was adopted.<sup>47,48</sup> Wavenumber ranges with negligible significance were removed and thus only the fingerprint (679–1780  $\text{cm}^{-1}$ ) and the high wavenumber regions (2690–3096  $\text{cm}^{-1}$ ) were considered. Afterwards, the Raman spectra were vector-normalized to make them comparable. Here, the spectrum was divided by its 2-norm. With a principal component analysis (PCA) the dimensionality of the problem was reduced and, in addition, white noise was removed by cutting off the scores after a particular channel in the new spectral space. The exact number of the applied scores depends on the size of the dataset. A good choice of score numbers for the created dataset is to use 5–10% of the number of data points. The reduction of the dimensionality of the dataset is necessary to avoid over-fitting.

A new independent dataset for identification was pre-processed in the same way. To convert both sets in the same spectral space we did not perform a PCA with the combined dataset, but rather rotated the new set by the loadings of the PCA of the first dataset into the spectral space of the first dataset.



[View Online](#)

After the pre-processing was done the classifier was trained. Linear discriminant analysis (LDA) as a binary classifier was chosen for the evaluation of the data. For this, the dataset was split into two parts: one for training the model, the other for the validation of the latter. The training data originated for each species and matrix from two independently prepared batches, which were separately cultured and extracted under exactly the same conditions. Cross-validation was performed to estimate the quality of the classifier. The validation data contained spectra from a third batch. These were labelled on basis of the training model created beforehand. The accuracy given by this calculation was used as the accuracy of the classifier. Additionally, sensitivity (true-positive rate) and specificity (true-negative rate) for each species were calculated.

## Results and discussion

For the evaluation of two possible isolation methods, different aspects have to be taken into account: The isolation methods should provide a good yield and should be practicable for use with Raman spectroscopic investigations. Besides this point, the influence of the isolation method on the Raman spectra has to be analysed to guarantee a subsequent identification with chemometric methods. In the following, these topics will be discussed in detail.

### Yield

Investigations to assess the bacterial yield of the isolation techniques were performed by viable cell counting. Under these conditions, the native microflora of milk was not an issue, since the applied growth conditions and times were unfavourable for e.g. *Lactobacillus* species.

Milk samples were spiked with *Escherichia coli* DSM 501 in a concentration range of  $10^3$  to  $10^9$  cells per 500  $\mu$ l UHT milk. After isolation by means of BDC a yield of approximately 10 to 30% of the starting concentration was achieved as summarized in Table 1 for two independent replicates. Thereby yields were obtained, which obviously did not correlate with the respective starting concentrations and showed only minor scattering. The achieved yields were almost in the same order of magnitude as the recovery rate of about 22.7%, which is published by Fukushima *et al.* for *E. coli* O157 from milk<sup>4</sup> despite the modified extraction procedure.

To also evaluate the recovery rate of the enzymatic procedure of Gunasekera *et al.*, UHT milk was again spiked with different concentrations of *E. coli* DSM 501. In two independently prepared batches, concentrations were chosen between  $10^3$  and  $10^8$  cells per 100  $\mu$ l UHT milk, which is in a similar region Gunasekera *et al.* used.<sup>40</sup> Table 1 demonstrates that recovery yields of ca. 9 to 53% depending on the inoculated cell numbers were obtained of both replicates. For higher starting concentrations the recovery was more efficient than for the lower concentrated samples, as for example the yields of 44 to 53% for  $10^8$  cells per 100  $\mu$ l milk were higher compared to only 9 to 18% for  $10^3$  cells per 100  $\mu$ l. A possible explanation for these losses could be the bactericidal character of the enzyme Savinase.<sup>49</sup> Gunasekera *et al.* achieved yields of almost 100% and detected and enumerated viable and non-viable cells primarily by means of flow cytometry. The effect of the milk-clearing procedure on bactericidal viability was not an issue in their considerations.<sup>49</sup>

Since most of the applied isolation techniques for food investigations exhibit a loss of bacterial cells of one order of magnitude the methods herein presented show slightly better results.

Both techniques allowed extraction of bacterial quantities from milk, which seem to be sufficient for Raman spectroscopy. For the MC isolation process it has to be considered that a fraction of the isolated cells were not viable anymore and might therefore hamper the Raman spectroscopic identification.

### Compatibility of the isolation methods towards Raman spectroscopy

Raman spectra of untreated microorganisms were compared with those of BDC- and MC-isolated bacteria from distilled water and UHT milk to analyse the influences of the extraction method, the matrix itself and further to evaluate the compatibility of the extraction method with Raman spectroscopic studies.

Raman spectra of extracted bacteria from distilled water can bear spectral artefacts due to the chemicals and the centrifugation process used, which spectra of untreated bacteria should not have. Spectral variations caused by the matrix milk on the other hand may be elucidated by comparing the milk- with the water-isolated bacterial spectra. Therefore a dataset of all investigated *Pseudomonas* species (*P. fragi*, *P. putida*, *P. stutzeri*) and matrices (water and milk) was generated for each isolation technique (BDC and MC) and grouped into three classes: "untreated" (n),

**Table 1** Viable cell counts (VC) and recovery rate (%) of two independent replicates of *Escherichia coli* DSM 501 inoculated in UHT milk (in various inoculation concentrations) after extraction by BDC and MC;  $c_0$  = inoculation cell number per sample volume<sup>a</sup>

Buoyant density centrifugation (BDC)						Milk clearing (MC)					
Sample 1			Sample 2			Sample 1			Sample 2		
$c_0$ per 500 $\mu$ l	VC	Recovery rate	$c_0$ per 500 $\mu$ l	VC	Recovery rate	$c_0$ per 100 $\mu$ l	VC	Recovery rate	$c_0$ per 100 $\mu$ l	VC	Recovery rate
$2.4 \times 10^3$	$6.8 \times 10^4$	28.3%	$3.1 \times 10^8$	$3.2 \times 10^7$	10.3%	$3.2 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	44.4%	$3.2 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	53.0%
$2.4 \times 10^7$	$2.7 \times 10^6$	11.3%	$3.1 \times 10^7$	$3.4 \times 10^6$	11.0%	$3.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^7$	51.3%	$3.2 \times 10^7$	$2.8 \times 10^6$	8.8%
$2.4 \times 10^5$	$5.4 \times 10^4$	22.5%	$3.1 \times 10^5$	$4.3 \times 10^4$	13.9%	$3.2 \times 10^5$	$3.7 \times 10^4$	11.6%	$3.2 \times 10^5$	$7.0 \times 10^4$	21.9%
$2.4 \times 10^3$	$8.5 \times 10^2$	35.0%	$3.1 \times 10^3$	$9.7 \times 10^2$	31.3%	$3.2 \times 10^3$	$3.0 \times 10^2$	9.4%	$3.2 \times 10^3$	$6.0 \times 10^2$	18.8%

<sup>a</sup> Note that the inoculum sizes were chosen in comparison to the literature and do not necessarily represent the detection limit of these methods.

“milk” (m) and “water” (w). Accordingly, the classes “untreated” and “water” include 3 batches, one of every *Pseudomonas* species, whereas the class “milk” contains nine batches, since each *Pseudomonas* species is isolated from three independent batches. Herein untreated bacteria were directly suspended from cultivation plates, whereas the microorganisms of the other two classes were isolated from the respective matrix.

Mean spectra (n, m, w) of each of the classes were calculated and are shown in Fig. 1(A) for BDC and Fig. 2(A) for MC. At first glance all mean Raman spectra can be recognized as typical microbial spectra, including all essential DNA and protein signatures and show no remarkable differences in the fingerprint region, independent of the extraction procedure. Difference spectra between the mean spectra of the untreated and the water (w – n) or milk and water (m – w) isolated bacteria were calculated to show variances in the spectra in more detail. The difference spectra (w – n) shown in Fig. 1 (BDC) and Fig. 2 (MC) were calculated with the mean spectra of water-extracted and untreated bacteria. While positive difference peaks provide an explanation about the influences of the isolation procedure, negative peak values reflect increased signal intensities in the untreated, native bacteria spectra.

**Buoyant density centrifugation (BDC).** In the case of buoyant density centrifugation, slightly negative difference signals were obtained (Fig. 1(A) (w – n)) at 1000 cm<sup>-1</sup> (phenylalanine), 1447 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub> deformation) and in the CH-region at 2850 cm<sup>-1</sup> and 2900 cm<sup>-1</sup>, which were attributable to untreated bacteria. After isolation, the spectra seemingly exhibit stronger amide I (1665 cm<sup>-1</sup>) and amide II (1477 cm<sup>-1</sup>) bands, manifested in positive difference signals.

In the following, the influences of the matrix milk on the Raman spectra will be discussed. In doing so, a difference spectrum between the mean spectra of milk- and water-extracted bacteria was calculated for BDC. The difference spectrum (m – w) shown in Fig. 1 reveals increased signal intensities of milk-isolated bacteria at 1242 cm<sup>-1</sup> (amide III), 1477 cm<sup>-1</sup> (amide II) and 1665 cm<sup>-1</sup> (amide I) in comparison with bacteria extracted from water. The positive difference signals at 719 cm<sup>-1</sup> (DNA), 781 cm<sup>-1</sup> (DNA) and 1000 cm<sup>-1</sup> (phenylalanine) indicate

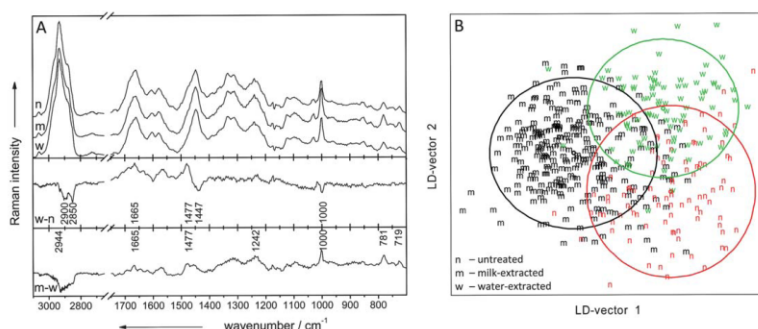
variations in the DNA concentration. In conclusion, it is apparent that milk influences the growth and composition of the investigated bacteria. Nevertheless, also a slight variation originating from the isolation step can be observed.

**Milk clearing (MC).** Analysing possible influences due to the MC extraction procedure, the upper difference spectrum (w – n) in Fig. 2 shows some changes. Positive bands at 1000 cm<sup>-1</sup> (phenylalanine) and 1447 cm<sup>-1</sup> (CH<sub>2</sub> deformation vibration of proteins) and a stronger negative signal at 1477 cm<sup>-1</sup> (amide II) can be understood as influence of the extraction method itself. This may be caused by changes in the membrane of bacteria, which can be affected by the applied enzyme, since Savinase cleaves peptide bonds of proteins, which are usually present in milk, but could also be found in the microbial membrane.

Additionally, the mean spectrum of the untreated bacteria bears variations in the CH-region in comparison to that of the water-isolated bacteria, similar to the difference spectrum of BDC analysis in Fig. 1(A) (w – n). Especially the band at 2944 cm<sup>-1</sup> was emphasized in untreated microorganisms as compared with those isolated from water, while the water extracts show a significant signal at 2850 cm<sup>-1</sup>.

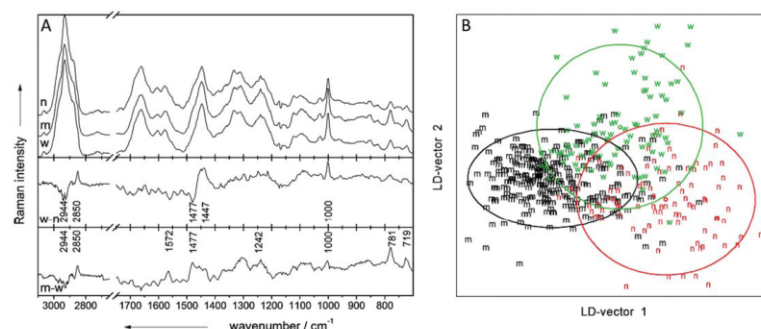
Concerning the spectral analysis of MC isolates, the difference spectrum (m – w) shown in Fig. 2 exhibits increased positive peaks of a number of bands belonging to different protein (1000, 1242 and 1477 cm<sup>-1</sup>) and DNA vibrations (719, 781 and 1572 cm<sup>-1</sup>), which indicate a higher protein and DNA concentration of milk-cultivated organisms similar to BDC isolates and so possibly another microbial growth pathway as compared with those isolated from water. These findings correlate with the literature proposing that cultivation media and incubation conditions influence the growth of bacteria.<sup>50–52</sup> Changes caused by these factors can manifest itself as variations in the Raman spectra.<sup>53</sup>

To visualize the variability between the three classes milk (m), water (w) and untreated (n) more thoroughly, linear discriminant analysis with a preceding principal component analysis (PCA) for dimension reduction was applied to the data, which comprise spectra of three milk-isolated batches, one water-isolated and one untreated batch of each of the three *Pseudomonas* species



**Fig. 1** A: mean spectra of all analysed *Pseudomonas* spp. isolated by BDC and grouped into three classes: untreated (n), water-isolated (w) and milk-extracted (m), also difference spectra of w – n and m – w are shown. B: score-plot of LD-vector 1 and LD-vector 2 of these three classes.



[View Online](#)

**Fig. 2** A: mean spectra of all analysed *Pseudomonas* spp. isolated by MC and grouped into three classes: untreated (n), water-isolated (w) and milk-extracted (m), additionally the difference spectra of the mean spectra of w – n and m – w are shown. B: score-Plot of LD-vector 1 and LD-vector 2 of these classes.

(approximately 450 spectra). The scatter plots based on the outcomes of these calculations using 20 principal components (PCs) are shown next to the mean spectra in Fig. 1(B) and also in Fig. 2(B) with respect to the investigated isolation methods. In both cases LD-vector 1 and LD-vector 2 are displayed. Corresponding to the scores of each class confidence intervals (95%) are calculated and displayed as ellipses. The score-plots of both analysed extraction procedures reveal a high similarity, since the ellipses overlap each other to a great extent. The classes could thus not be separated clearly by this chemometrical method. This implies a strong homogeneity between all three classes, which confirms the results of the difference spectra. In summary, the bacterial Raman spectra isolated from water or milk show only minor variations as compared with the Raman spectra of untreated cells taken directly from agar plates. Calculating the variability among the three classes of Raman spectra by means of LDA leads to a high homogeneity. Therefore both isolation techniques seem to be compatible to be used in the context of Raman spectroscopic investigations on bacteria extracted from milk, whereas the influences of Savinase as a bactericidal enzyme on the microorganisms could not be clarified.

Similar results were obtained for *Escherichia coli* regarding the influence of the isolation technique as well as the effect of a milk matrix onto the microbial Raman spectra (data not shown).

These minimal spectral variations allow focusing solely on milk-isolated bacteria to validate the feasibility of the investigated extraction procedures to identify microbial single cells.

#### Influence of the isolation on classification and identification

Multivariate statistics on an ensemble of the data were performed to find out if a differentiation between the investigated species (*Pseudomonas* and *E. coli*) is realisable.

For both of the extraction procedures, approximately 60 Raman spectra of two independently prepared batches of each of the milk-isolated bacteria species were measured and compiled to build a classification model based on LDA. A third independent batch (30 spectra each) was used to validate this model.

For each dataset ca. 300 spectra were classified via linear discriminant analysis with 32 PCs. The number of the chosen PCs was the best compromise between minimal number of PCs and high model accuracy.

**Buoyant density centrifugation (BDC).** The spectra of the BDC-extracted bacteria from milk were classified with an overall accuracy of 96% as shown in the confusion matrix in Table 2(A). High specificities (98–100%) for all investigated species were obtained. Hereby the discrimination of the spectra on the genus level was entirely correct for *Pseudomonas* (180/180 spectra, 100%) and with only one misclassified *E. coli* spectrum (121/122 spectra, 99.2%). Among the three *Pseudomonas* species the sensitivities vary from 88 to 98%, since *Pseudomonas putida* bears a few spectra falsely classified as *Pseudomonas fragi*. To visualize these results, Fig. 3(A) depicts the score-plot of LD-vector 1 against LD-vector 2, in which the ellipses represent the confidence interval, where 95% of the class spectra can be found. All spectra of the four classes are clearly arranged into single clusters. Each cluster can be assigned to one of the investigated species: *E. coli* (a), *P. fragi* (b), *P. putida* (c) and *P. stutzeri* (d). While LD-vector 1 is primarily responsible for the separation of *E. coli* from *Pseudomonas* spp., LD-vector 2 and 3 (not shown) discriminate the different species of *Pseudomonas*.

This model system was utilized to identify 152 single Raman spectra of bacteria, which were independently cultivated and measured. 136 of the 152 spectra (91% accuracy rate) were assigned into their corresponding class, as Table 2(B) displays. Only between the classes *P. fragi* and *P. putida* considerable misclassification occurred, which accounts for the relatively low sensitivities (below 80%) of these two species.

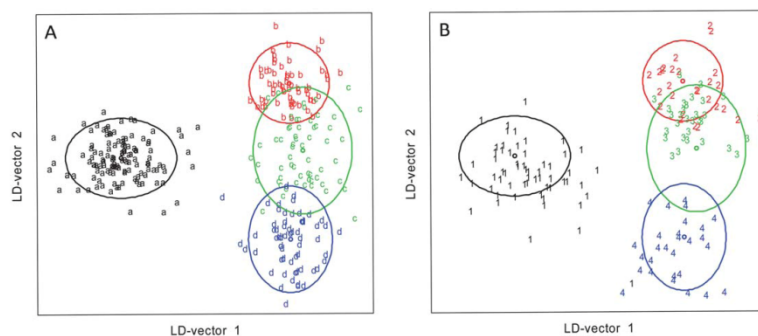
The arrangement of the validation spectra alongside the vectors established by the LDA-model is shown in Fig. 3(B). Here, again the circles are the same as in Fig. 3(A) and therefore define the borders, in which 95% of the model data for the respective class was allocated to. It can be clearly seen that most of the identification spectra are within the borders of their related group. This especially holds true for the *E. coli* (1) and *P. stutzeri*

**Table 2** LDA classification (A) and identification (B) results for spectra of milk-extracted bacteria by means of Percoll buoyant density centrifugation (BDC)

(A)						
Classified	True				Specificity/%	Sensitivity/%
	<i>E. coli</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>		
<i>E. coli</i>	121	0	0	0	100	99.2
<i>P. fragi</i>	0	59	5	0	97.9	98.3
<i>P. putida</i>	1	1	53	3	97.9	88.3
<i>P. stutzeri</i>	0	0	2	57	99.2	95.0

(B)						
Identified	True				Specificity/%	Sensitivity/%
	<i>E. coli</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>		
<i>E. coli</i>	59	0	0	0	96.7	98.3
<i>P. fragi</i>	0	24	6	0	80.0	80.0
<i>P. putida</i>	0	6	24	1	80.0	75.0
<i>P. stutzeri</i>	1	0	2	29	96.7	96.7

**Fig. 3** LDA score-plot (A) for classification of *E. coli* (a), *P. fragi* (b), *P. putida* (c) and *P. stutzeri* (d) extracted from milk by means of Percoll buoyant density centrifugation calculated and also for identification (B) of an independent dataset of *E. coli* (1), *P. fragi* (2), *P. putida* (3), *P. stutzeri* (4).

(4) data, which also manifests itself in the identification rate of 97% for both species in Table 2(B). The rather narrow positioning of the *P. fragi* (2) and *P. putida* (3) spectra in Fig. 3(B) explains their moderate sensitivity values summarized in Table 2 (B). The good correspondence of the validation data with those from the model allows drawing the conclusion that the applied preparation procedure (BDC) as well as the chemometrical analysis method is suitable to identify the herein considered bacteria isolated from unknown milk samples.

**Milk clearing (MC).** The confusion matrix displayed in Table 3 (A) represents the classification data of the investigated strains isolated from milk by means of milk clearing with a moderate overall accuracy of 88%. The sensitivities and specificities of *E. coli* accounted for almost 100% (110 of 111 spectra correctly classified), whereas the classification rates of the three *Pseudomonas* species were in the range of 71 to 88%, because of noteworthy cross-classifications in between this genus.

These results are also illustrated in the scatter-plot of LD-vector 1 versus 2 (Fig. 4(A)). It can be seen that the *E. coli* spectra are well separated from the others as opposed to the closely adjacent point clouds of *P. fragi* (b), *P. putida* (c), and *P. stutzeri* (d). Mainly LD-vector 1 is responsible for the distinction of *E. coli* (a) from *Pseudomonas* spp. Alongside LD-vector 2 the spectra of the *Pseudomonas* were indifferently clustered and showed extensive scattering.

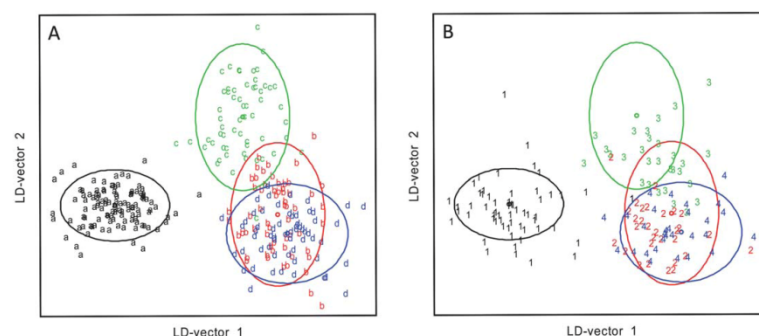
The results of an attempt to identify 120 spectra of four independent samples via this model are represented in Fig. 4(B). Most of the *E. coli* (1) spectra were placed inside their class-related confidence interval. The *Pseudomonas* spectra (2–4), however, did not distribute themselves in the expected regions and tend to mix up with each other. These results were manifested in Table 3(B), too. While the identification of *E. coli* was performed properly with 98%, interspecies differentiation of *Pseudomonas* worked out only partly (47–93%). Therefore the model was not able to differentiate between the different

[View Online](#)**Table 3** LDA classification (A) and identification (B) results from spectra of microorganisms extracted from milk by means of an enzymatic procedure with Savinase (MC)

(A)						
Classified	True				Specificity%	Sensitivity%
	<i>E. coli</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>		
<i>E. coli</i>	<b>110</b>	0	0	0	99.4	99.2
<i>P. fragi</i>	1	<b>43</b>	5	10	93.1	71.7
<i>P. putida</i>	0	5	<b>53</b>	0	97.8	88.3
<i>P. stutzeri</i>	0	12	1	<b>50</b>	94.4	83.3

(B)						
Identified	True				Specificity%	Sensitivity%
	<i>E. coli</i>	<i>P. fragi</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>		
<i>E. coli</i>	<b>59</b>	0	0	0	100	98.3
<i>P. fragi</i>	0	<b>16</b>	15	2	85.8	53.3
<i>P. putida</i>	0	1	<b>14</b>	0	99.2	46.7
<i>P. stutzeri</i>	1	13	1	<b>28</b>	87.5	93.3

**Fig. 4** LDA score-plot (A) for classification of *E. coli* (a), *P. fragi* (b), *P. putida* (c) and *P. stutzeri* (d) extracted from milk by means of milk clearing calculated and also for identification (B) of an independent dataset of *E. coli* (1), *P. fragi* (2), *P. putida* (3), *P. stutzeri* (4).

species of the *Pseudomonas* group, but allows identifying *E. coli* from the others. Thus, only an identification accuracy of 78% was obtained.

In summary, significant differences in the classification results (overall accuracy for BDC: 96% and MC: 88%) as well as identification results (overall accuracy for BDC: 91% and MC: 78%) between the species isolated by means of the two investigated isolation procedures were demonstrated. While all four of the BDC isolated species were identified with sufficient rates, especially the MC extracted species *P. fragi* and *P. putida* (sensitivity of approx. 50%) were poorly discriminated based on their identification data. The effect of Savinase as a bactericidal enzyme on the cells could be an explanation for this outcome, because it cannot be excluded that enzyme affected cells were unintentionally measured describing the changes in the Raman signature. Therefore the spectral information responsible for the interspecies discrimination might be levelled and thus lower the identification accuracies.

## Conclusion

In this study, *Pseudomonas* spp. and *E. coli* were extracted from UHT milk with BDC and MC and afterwards analysed by means of Raman spectroscopy in order to investigate the Raman compatibility of these isolation methods for identification of the bacteria on a single cell level.

Altogether, both methods allow for separation and concentration of bacteria from milk in one easily performable sample preparation step with small sample volume (100 µl to 500 µl) and within one hour, which is suitable for processing many samples within a short timescale and with moderate recovery rates. Further investigations highlighted that especially BDC can be used in combination with Raman spectroscopy to identify bacteria as contaminants in milk without culture enrichment. BDC isolation appears to be more robust, since the results given in these investigations are consistently better in comparison to the MC data: with BDC isolation a bacterial yield of 11 to 30% is

achieved independent of the starting concentration from  $10^3$  to  $10^8$  cells per 500  $\mu$ l milk, while MC extraction shows inconsistent results depending on the chosen concentrations.

At first glance, grave spectral artefacts caused by the matrix itself or especially by the extraction techniques were not obvious. But via chemometric analysis, it could be shown that these factors noticeably influence the identification rates: bacteria can be identified with an overall accuracy of 91% when extracted by means of BDC from UHT milk. On the other hand the identification of bacteria extracted via MC did not work well (78%).

For further investigations, BDC isolation is applicable in combination with micro-Raman spectroscopic analyses to create a Raman spectral database of milk-relevant pathogens, which allows rapid identification of unknown microbial contaminations in milk.

### Acknowledgements

Funding of the research project 'PathoSafe' FKZ 13N9547 and FKZ 13N9549 from the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF) and further the European Union and the Thüringer Aufbaubank (EFRE) for funding the research project QualyScan (2008 FE 9152) is gratefully acknowledged.

### References

- H. Fukushima, K. Katsube, Y. Hata, R. Kishi and S. Fujiwara, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 92–100.
- A. H. Soomro, M. A. Arain, M. Khaskheli and B. Bhutto, *Pak. J. Nutr.*, 2002, **1**, 151–152.
- W. Hayes, C. H. White and M. A. Drake, *J. Food Sci.*, 2002, **67**, 448–454.
- T. S. Gunasekera, M. R. Dorsch, M. B. Slade and D. A. Veal, *J. Appl. Microbiol.*, 2003, **94**, 936–945.
- G. Uraz and S. Citak, *J. Basic Microbiol.*, 1998, **38**, 129–134.
- M. Wiedmann, D. Weilmeyer, S. S. Dineen, R. Ralyea and K. J. Boor, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2085–2095.
- C. Gras-Le Guen, D. Lepelletier, T. Debillon, V. Gournay, E. Espaze and J. C. Roze, *Arch. Dis. Child.*, 2003, **88**, F434–F435.
- G. Kumaseran and R. Annal Villi, *J. Vet. Anim. Sci.*, 2008, **4**, 56–59.
- N. Nicolau and R. Goodacre, *Analyst*, 2008, **133**, 1424–1431.
- P. Daly, T. Collier and S. Doyle, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2002, **34**, 222–226.
- A. Kitaguchi, N. Yamaguchi and M. Nasu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 2748–2752.
- P. Wolffs, R. Knutsson, B. Norling and P. R. Radstrom, *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 1042–1047.
- K. Maquelin, C. Kirschner, L. P. Choo-Smith, N. van den Braak, H. P. Endtz, D. Naumann and G. J. Puppels, *J. Microbiol. Methods*, 2002, **51**, 255–271.
- N. A. Ngo-Thi, C. Kirschner and D. Naumann, *J. Mol. Struct.*, 2003, **661**, 371–380.
- D. Naumann, S. Keller, D. Helm, C. Schultz and B. Schrader, *J. Mol. Struct.*, 1995, **347**, 399–405.
- D. Naumann, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. R. A. Meyers, John Wiley & Sons, Chichester, 2000, pp. 102–131.
- N. Nicolau, Y. Xu and R. Goodacre, *J. Dairy Sci.*, 2010, **93**, 5651–5660.
- P. Rösch, M. Schmitt, W. Kiefer and J. Popp, *J. Mol. Struct.*, 2003, **661**, 363–369.
- W. E. Huang, M. Q. Li, R. M. Jarvis, R. Goodacre and S. A. Banwart, *Adv. Appl. Microbiol.*, 2010, **70**, 153–186.
- S. Stöckel, W. Schumacher, S. Meisel, M. Elschner, P. Rösch and J. Popp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, **76**, 2895–2907.
- B. S. Luo and M. Lin, *J. Rapid Methods Autom. Microbiol.*, 2008, **16**, 238–255.
- K. S. Kalasinsky, T. Hadfield, A. A. Shea, V. F. Kalasinsky, M. P. Nelson, J. Neiss, A. J. Drauch, G. S. Vanni and P. J. Treado, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2658–2673.
- K. Gaus, P. Rösch, R. Petry, K.-D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, K. Baumann and J. Popp, *Biopolymers*, 2006, **82**, 286–290.
- N. Tarcea, M. Harz, P. Rösch, T. Frosch, M. Schmitt, H. Thiele, R. Hochleitner and J. Popp, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2007, **68**, 1029–1035.
- W. H. Nelson, R. Manoharan and J. F. Sperry, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 1992, **27**, 67–124.
- P. Rösch, M. Harz, M. Schmitt, K. D. Peschke, O. Ronneberger, H. Burkhardt, H. W. Motzkus, M. Lankers, S. Hofer, H. Thiele and J. Popp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, **71**, 1626–1637.
- A. Harz, P. Rösch and J. Popp, *Cytometry, Part A*, 2009, **75A**, 104–113.
- K. C. Schuster, E. Urlaub and J. R. Gapes, *J. Microbiol. Methods*, 2000, **42**, 29–38.
- M. Harz, M. Kiehnopf, S. Stöckel, P. Rösch, E. Straube, T. Deufel and J. Popp, *J. Biophotonics*, 2009, **2**, 70–80.
- M. Krause, B. Radt, P. Rösch and J. Popp, *J. Raman Spectrosc.*, 2007, **38**, 369–372.
- M. Culha, M. Kahraman, D. Cam, I. Sayin and K. Keseroglu, *Surf. Interface Anal.*, 2010, **42**, 462–465.
- M. Knauer, N. P. Ivleva, X. J. Liu, R. Niessner and C. Haisch, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2766–2772.
- E. Temur, I. H. Boyaci, U. Tamer, H. Unsal and N. Aydogan, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 1595–1604.
- R. M. Jarvis, A. Brooker and R. Goodacre, *Faraday Discuss.*, 2006, **132**, 281–292.
- R. M. Jarvis and R. Goodacre, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 40–47.
- A. Walter, A. März, W. Schumacher, P. Rösch and J. Popp, *Lab Chip*, 2011, **11**, 1013–1021.
- R. Lindqvist, B. Norling and S. T. Lambert, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1997, **24**, 306–310.
- R. Lindqvist, *Int. J. Food Microbiol.*, 1997, **37**, 73–82.
- H. Pertoft, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2000, **44**, 1–30.
- T. S. Gunasekera, P. V. Attfield and D. A. Veal, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 1228–1232.
- J. Fox, *J. Stat. Software*, 2005, **14**, 1–42.
- R: Development-Core-Team, *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008.
- U. Schmid, P. Rösch, M. Krause, M. Harz, J. Popp and K. Baumann, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2009, **96**, 159–171.
- V. Vapnik, *The Nature of Statistical Learning Theory*, Springer-Verlag New York, Inc., New York, NY, 1995.
- T. Bocklitz, M. Putsche, C. Stüber, J. Käs, A. Niendorf, P. Rösch and J. Popp, *J. Raman Spectrosc.*, 2009, **40**, 1759–1765.
- W. Schumacher, M. Kühnert, P. Rösch and J. Popp, *J. Raman Spectrosc.*, 2011, **42**, 383–392.
- C. G. Ryan, E. Clayton, W. L. Griffin, S. H. Sie and D. R. Cousens, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B*, 1988, **34**, 396–402.
- M. Morhás, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. A*, 2009, **600**, 478–487.
- E. M. Smith, L. E. Green and D. Mason, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 719–720.
- D. Hutsebaut, K. Maquelin, P. De Vos, P. Vandenabeele, L. Moens and G. J. Puppels, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 6274–6281.
- V. Ciobotă, E.-M. Burkhardt, W. Schumacher, P. Rösch, K. Küsel and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **397**, 2929–2937.
- S. Stöckel, S. Meisel, R. Bohme, M. Elschner, P. Rösch and J. Popp, *J. Raman Spectrosc.*, 2009, **40**, 1469–1477.
- A. Walter, M. Reinicke, T. Bocklitz, W. Schumacher, P. Rösch, E. Kothe and J. Popp, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 2763–2773.

## 2.3 Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Detection of *Brucella* spp. in Milk

[SM3]

Susann Meisel	Kultivierung und Aufarbeitung der Bakterien Raman-mikrospektroskopische Messungen Datenanalyse und -auswertung Erstellung des Manuskripts
Stephan Stöckel	Raman-mikrospektroskopische Messungen Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Mandy Elschner	Bereitstellung der Proben Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Falk Melzer	Bereitstellung der Proben Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts

*Applied and Environmental Microbiology* **2012**, 78(16), 5575–5583

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von  
*American Society for Microbiology.*

Applied and Environmental  
Microbiology

## Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Detection of *Brucella* spp. in Milk

Susann Meisel, Stephan Stöckel, Mandy Elschner, Falk  
Melzer, Petra Rösch and Jürgen Popp  
*Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78(16):5575. DOI:  
10.1128/AEM.00637-12.  
Published Ahead of Print 1 June 2012.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://aem.asm.org/content/78/16/5575>

---

### SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

[http://aem.asm.org/content/suppl/2012/07/18/AEM.00637-12.D  
CSupplemental.html](http://aem.asm.org/content/suppl/2012/07/18/AEM.00637-12.DCSupplemental.html)

### REFERENCES

This article cites 55 articles, 9 of which can be accessed free at:  
<http://aem.asm.org/content/78/16/5575#ref-list-1>

### CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new  
articles cite this article), [more»](#)

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

Journals.ASM.org

Downloaded from <http://aem.asm.org/> on September 10, 2012 by THURINGER UNIVERSITÄTS





## Raman Spectroscopy as a Potential Tool for Detection of *Brucella* spp. in Milk

Susann Meisel,<sup>a</sup> Stephan Stöckel,<sup>a</sup> Mandy Elschner,<sup>b</sup> Falk Melzer,<sup>b</sup> Petra Rösch,<sup>a</sup> and Jürgen Popp<sup>a,c</sup>

Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University Jena, Jena, Germany<sup>a</sup>; Friedrich Loeffler Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Jena, Germany<sup>b</sup>; and Institute of Photonic Technology, Jena, Germany<sup>c</sup>

Detection of *Brucella*, causing brucellosis, is very challenging, since the applied techniques are mostly time-demanding and not standardized. While the common detection system relies on the cultivation of the bacteria, further classical typing up to the bio-type level is mostly based on phenotypic or genotypic characteristics. The results of genotyping do not always fit the existing taxonomy, and misidentifications between genetically closely related genera cannot be avoided. This situation gets even worse, when detection from complex matrices, such as milk, is necessary. For these reasons, the availability of a method that allows early and reliable identification of possible *Brucella* isolates for both clinical and epidemiological reasons would be extremely useful. We evaluated micro-Raman spectroscopy in combination with chemometric analysis to identify *Brucella* from agar plates and directly from milk: prior to these studies, the samples were inactivated via formaldehyde treatment to ensure a higher working safety. The single-cell Raman spectra of different *Brucella*, *Escherichia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, and *Yersinia* spp. were measured to create two independent databases for detection in media and milk. Identification accuracies of 92% for *Brucella* from medium and 94% for *Brucella* from milk were obtained while analyzing the single-cell Raman spectra via support vector machine. Even the identification of the other genera yielded sufficient results, with accuracies of >90%. In summary, micro-Raman spectroscopy is a promising alternative for detecting *Brucella*. The measurements we performed at the single-cell level thus allow fast identification within a few hours without a demanding process for sample preparation.

In many respects, the detection of *Brucella* bacteria is very challenging. These small, coccoidal, and Gram-negative microorganisms are well-known biosafety level 3 (BSL-3) agents, which always bear a high risk for clinical and laboratory handling (4, 19, 58, 59), even if all safety measures are performed with the utmost care to avoid infections. This is supported by the fact that the health hazard of the bacteria causing brucellosis can be caused by small infection doses of 10 to 100 organisms as an aerosol to infect humans and by their potential as a biological warfare agent (13, 30, 58). Despite the low mortality rate of brucellosis, the zoonosis remains an important public health problem in wide areas of the world. The incidence of infection is especially high in regions such as the Middle East and countries bordering the Mediterranean Sea, as well as in China, Peru, and Mexico (31). In this context, humans were usually infected incidentally by contact with contagious animals or consumption of dairy foods, which were contaminated by *Brucella* species (13, 58).

Although all *Brucella* species are virulent, the major known pathogens for human brucellosis are *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, and *B. canis* (51). The virulence is associated with changes in the composition of the lipopolysaccharides (LPS) in the outer cell membrane expressed in different colony morphologies: rough and smooth. Thereby, the smooth phenotype is regarded as fully virulent, whereas the species with rough surfaces seem to be less virulent (44). However, several exceptions from this rule exist: in contrast to the others, for example, *B. canis* appears to be naturally rough but causes occasional infections in humans (44).

Since brucellosis is a rare disease in industrialized countries, laboratories are often unfamiliar with the genus *Brucella*, and detection systems are often not reliable or sensitive enough. Even though the commonly used microbiological plating techniques for detection of *Brucella* are supplemented by more sophisticated

and sensitive molecular genetic techniques such as PCR (27, 33, 51, 57, 60) or immunological assays such as the enzyme-linked immunosorbent assay (14), the handling and identification of this organism is still complicated. Bacterial culture techniques are hampered by a long cultivation time. Furthermore, the application of the cost-intensive PCR is limited when the detection of bacteria directly out of food is necessary, since an ability to detect them is influenced by PCR-inhibitory substances associated with the food matrix (37). In the case of *Brucella*, detection in milk and other dairy products is particularly complicated (2).

In addition, it has been reported that biochemical detection systems are not optimized for that agents, which causes unsafe identification or even misidentification of *Brucella* (3), most often as *Ochrobactrum* spp. (10, 50, 53) as result of PCR or as *Yersinia* spp. (49) in cross-reactions in serological analyses. In this context, the discrimination of the different *Brucella* species is even more problematic (60). These factors emphasize the need for a rapid and more efficient detection system.

Since vibrational spectroscopy, including infrared absorption (25, 26, 29, 55) and—in particular—all facets of Raman spectroscopy, has proved to be an appropriate tool for the rapid identification of microorganisms (35, 36), it could also be a promising approach for detecting BSL-3 agents (17), such as *Brucella*, by analyzing molecule-specific fingerprint information. A wide

Received 28 February 2012 Accepted 23 May 2012

Published ahead of print 1 June 2012

Address correspondence to Petra Rösch, petra.roesch@uni-jena.de.

Supplemental material for this article may be found at <http://aem.asm.org/>.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00637-12

Downloaded from <http://aem.asm.org/> on September 10, 2012 by THURINGER UNIVERSITÄT

Meisel et al.

range of different techniques are applicable. Although the resonant excitation in the UV wavelength region probes taxonomic markers, e.g., DNA/RNA vibrations (28, 48), the application of visible or NIR Raman excitation wavelengths allows for a phenotypic characterization (20). By applying micro-Raman spectroscopy, even bacterial identification on the single-cell level can be performed (8, 15, 43, 54), and thus elaborate precultivation can be avoided. Thus, the detection process of microorganisms can be accelerated significantly, which is especially important in areas susceptible to bacterial contamination, e.g., clinical environments or the food-processing industry.

In order to fully exploit the potential of micro-Raman spectroscopy as a reliable identification tool, versatile spectral databases have to be created to evaluate all of the spectral information by statistical classifiers, such as linear discriminant analysis or a support vector machine (40).

To detect *Brucella* in milk via micro-Raman spectroscopy, we prepared a list of relevant pathogens to be considered in this context. In addition to *Brucella* spp., we chose genetically closely related and pathogenic *Ochrobactrum* species, as well as *Yersinia* species, to check whether misidentification with *Brucella* is also problematic. *Pseudomonas* and *Escherichia* spp. were used as Gram-negative representatives, which are well known to also be typical contaminants in dairy products (9, 56). In summary, 20 different species or subspecies (seven *Brucella* species, two strains of *Escherichia*, four strains of *Ochrobactrum*, five *Pseudomonas* species, and two strains of *Yersinia*) were selected.

With respect to the misidentification problem, we first took into account whether *Brucella* identification via Raman spectroscopy is workable when the bacteria have been cultivated on nutrient agar under standard conditions. We further focused on the identification of *Brucella* biovar samples, which have not been implemented in the database before. Beyond that, the discrimination potential of micro-Raman spectroscopy to the different *Brucella* species as a further issue was tested.

A second aim was to identify *Brucella* directly from an environmental sample: milk. Due to the changed nutrient and incubation conditions by adaptation to the new matrix, it is probable that the bacterial growth behavior was modified (16, 45). Changes caused by these factors become manifest as variations in the bacterial Raman spectra. Since the data are no longer comparable with the database of bacteria from medium, a second independent database has to be set up. Therefore, milk samples were spiked with the bacteria, processed and analyzed.

In addition, since handling BSL-3 agents is always dangerous, a suitable formalin inactivation procedure was applied to the bacterial samples prior to the analysis. By doing so, the microorganisms were concentrated and resuspended in distilled water; in that way, any further technique to isolate bacteria from milk was not necessary.

## MATERIALS AND METHODS

**Species and strains.** The bacteria were chosen according to their presence as known milk contaminants and their potential to be health hazards. The following species were examined in the present study for the databases: seven species of *Brucella* (*B. abortus* BA544, *B. canis* RM6/66, *B. ceti* NCTC 12891, *B. melitensis* BM16M, *B. microti* CCM 4915, *B. pinnipedialis* NCTC 12890, and *B. suis* BS1330), two strains of *Escherichia coli* (DSM 613 and DSM 1085), four strains of *Ochrobactrum* (*O. anthropi* ATCC 49188, *O. anthropi* field strain 10RB0263, *O. intermedia* DSM 17986, and *O. intermedia* field strain 06RB0416), five species of *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*

TABLE 1 Sources of the investigated species

Organism	Strain	Biovar	Source <sup>a</sup>
<i>B. abortus</i>	BA544	1	ERL
	08RB1648 (field strain)	3	BfR
	08RB1653 (field strain)	4	BfR
<i>B. canis</i>	RM6/66		ERL
<i>B. ceti</i>	NCTC 12891		SAC
<i>B. melitensis</i>	BM16M	1	ERL
	09RB5269 (field strain)	2	FLI
	09RB5696 (field strain)	3	FLI
<i>B. microti</i>	CCM 4915		IMB
<i>B. pinnipedialis</i>	NCTC 12890		SAC
<i>B. suis</i>	BS1330	1	ERL
	09RB5757 (field strain)	2	FLI
	09RB5758 (field strain)	2	FLI
<i>E. coli</i>	DSM 613		DSMZ
	DSM 1085		DSMZ
<i>O. anthropi</i>	ATCC 49188		DSMZ
	10RB0263 (field strain)		FLI
<i>O. intermedia</i>	DSM 17986		DSMZ
	06RB0416 (field strain)		FLI
<i>P. aeruginosa</i>	DSM 1117		DSMZ
	DSM 50071		DSMZ
<i>P. fluorescens</i>	DSM 50106		DSMZ
<i>P. fragi</i>	DSM 3456		DSMZ
<i>P. putida</i>	DSM 291		DSMZ
<i>P. stutzeri</i>	DSM 5190		DSMZ
<i>Y. enterocolitica</i>	DSM 4780, O:3		DSMZ
	DSM 11504, O:5,27		DSMZ

<sup>a</sup> ERL, European Reference Laboratory for Brucellosis, Maisons Alfort, France; IMB, Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany; FLI, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Friedrich Loeffler Institute, Federal Research Institute for Animal Health, Jena, Germany; DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany.

DSM 1117, *P. aeruginosa* DSM 50071, *P. fluorescens* DSM 50106, *P. fragi* DSM 3456, *P. putida* DSM 291, and *P. stutzeri* DSM 5190), and two *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* serovars (*Y. enterocolitica* DSM 4780 [O:3] and *Y. enterocolitica* DSM 11504 [O:5,27]). In addition, six *Brucella* biovars were considered as "unknown" samples: *B. abortus* biovar 3, *B. abortus* biovar 4, *B. melitensis* biovar 2, *B. melitensis* biovar 3, and two different isolates of *B. suis* biovar 2. In Table 1, the details about the source of each investigated species are given.

**Sample preparation.** The *Brucella* spp. and *Ochrobactrum* spp. were grown according to the OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals ([www.oie.int](http://www.oie.int)). All other investigated species were cultivated on a standard nutrient agar for 24 h at an incubation temperature of 37°C.

The microorganisms from one plate were then suspended in 1 ml of 0.9% sodium chloride solution and cleaned three times by centrifugation at 12,100 × g for 1 min (MiniSpin; Eppendorf, Hamburg, Germany). Afterward, the bacterial pellet was resuspended in 0.9% sodium chloride solution. In this way, six independently cultivated batches of each species were prepared in order to take biological variability between the samples into account. Three of them were directly inactivated as described below,



while each of the other batches was inoculated in 1 ml of commercially available ultra-high-temperature-treated milk with a 1.5% fat content to a concentration of  $\sim 10^7$  cells/ml. At room temperature, the bacteria were allowed to adapt to the new matrix over a time period of 24 h. Afterward, the spiked milk samples were also inactivated via a formaldehyde treatment, which is a useful Raman-compatible procedure (47). The samples were mixed with 37% formaldehyde solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) in a 10-ml tube to a final concentration of 10% formaldehyde. During a treatment time of 1 h, the tubes were shaken continuously at 150 rpm in a laboratory shaker (Gerhardt Shaker RO 15). The treatment was stopped by centrifugation at  $2,200 \times g$  for 10 min. After three additional washes, including centrifugation, the bacterial pellet was resuspended in 1 ml of 0.9% sodium chloride solution. To determine a successful inactivation, 50  $\mu$ l of the bacterial solution was plated, followed by incubation at 37°C for a week. Only samples that showed no growth were used for Raman spectroscopic measurements. An inoculation loop with a volume of 1  $\mu$ l was used to load the nickel foil with the sample. Before starting the measurement, the sample was air dried.

**Spectroscopic instrumentation.** The Raman spectra were obtained with a micro-Raman setup (Bio-Particle Explorer; rap.ID Particle Systems GmbH, Berlin, Germany). A solid-state frequency-doubled Nd:YAG module (LCM-S-111-NNP25; Laser-Export Co., Ltd.) provides an excitation light with a wavelength of 532 nm. While an Olympus MPL-FLN-BD 100 $\times$  objective focuses the Raman excitation light onto the sample with a spot size of below 1  $\mu$ m laterally, the samples are hit with  $\sim 7$  mW of laser power. After removal of the Rayleigh scattering, the scattered Raman light is diffracted with a single-stage monochromator (HE 532; Horiba Jobin Yvon, Munich, Germany) equipped with a 920-line/mm grating and collected with a thermoelectrically cooled charge-coupled device (CCD) camera (DV401-BV; Andor Technology, Belfast, Northern Ireland) with a spectral resolution of  $\sim 10$   $\text{cm}^{-1}$ . The integration time per single Raman spectrum ( $\sim 113$  to  $3,186$   $\text{cm}^{-1}$ ) was 20 s, recorded as two 10-s measurements. These two spectra were compared afterward for spike removal and are summarized as one spectrum.

**Databases.** After the collection of all of the spectra for each sample ( $\sim 50$  single spectra per batch), two databases were created. All spectra for bacteria that were prepared on nutrient agar were centralized into a database named "medium" (3,761 spectra), while all spectra for the bacteria from milk were collected in a second database named "milk" (3,218 spectra). A more detailed breakdown of the data is given in Table SA1 in the supplemental material. In summary, two batches of each species were used to build the classification model, while an independent third batch was measured to identify them. This procedure is explained in the following section.

**Chemometric methods.** The analysis of the Raman spectra took place in three steps: (i) preprocessing, (ii) training of the self-learning machine, and (iii) validation (6, 42, 52) and is performed with Gnu R (34). Each spectrum was preprocessed in the same way in order to reduce the contribution from noise and also the spectral variations due to the measuring procedure. First, the background and the cosmic spikes of the spectra were removed. The importance of the background correction was given, since the effects of various backgrounds, caused by fluorescence of the sample or thermal fluctuations on the CCD, were minimized (7). For this purpose the SNIP algorithm (for statistics-sensitive nonlinear iterative peak clipping algorithm), which is a composite of a low statistics filter and a peak clipping algorithm, was adopted (23, 38). Cosmic spikes could be easily localized by recording two Raman spectra of the same microbial cell, since their origin is neither correlated in time nor space. Intensity differences for each channel were calculated and spikes located in channels, where the intensity difference exceeded twice the standard deviation.

After the spike removal, a wavenumber calibration using acetaminophen as a standard was performed on the spectra. In addition, only significant wave number regions ( $650$  to  $1,750$   $\text{cm}^{-1}$  and  $2,750$  to  $3,100$   $\text{cm}^{-1}$ ) were regarded to reduce data dimension. To ensure comparability be-

tween the spectra, vector normalization was conducted. Here, the spectra were divided by its 2-norm (Euclidean norm).

A principal component analysis (PCA) was performed prior to the linear discriminant analysis (LDA) to reduce the dimensionality of the problem. In addition, white noise can be removed by cutting off the scores after a particular channel in the new spectral space, and so the probability to find the best classification model representing the data can be increased (7). The exact number of the applied scores depends on the size of the data set and was separately determined for each calculation. The number of the chosen PCs was the best compromise between a minimal number of PCs and classification accuracy and practically never exceeded 10% of the whole spectral data to avoid overfitting. It should be mentioned that the PCA was only performed for the classification data set. To also convert the independent identification data in the same spectral space, the set was rotated by the loadings of the PCA of the preceding calculation.

After the data preprocessing was finished, the multivariate analyses were performed: LDA and support vector machine (SVM) were the classifiers of choice, since both strategies are widely used in pattern analysis of bacterial spectra (21, 47). Whereas LDA is performed with the scores from the PCA, the entire spectral information is used for SVM. A radial kernel function was chosen for SVM to map the data in a different space. The optimization of the values of cost and gamma allows some flexibility in separating the categories to create a more accurate classification model. A high cost value will force the SVM to create a complex enough prediction function to misclassify as few training points as possible, while a lower cost parameter will lead to a simpler prediction function (18).

A comparative study of both techniques was useful, since it is postulated that no specific classifier has the best fit for all problems and no classifier is always better than another one (39). This is especially true for experimental sciences dealing with real-world samples. Therefore, both classification algorithms were run on the same data set to compare their outputs for statistical significance. The accuracies given by these calculations were used as the accuracies of the classifiers. In addition, the sensitivity (the true-positive rate) and the specificity (the true-negative rate) for each genus or species was calculated. The spectra were smoothed by means of a Savitzky-Golay filter only for visualization.

## RESULTS

In order to investigate the potential of micro-Raman spectroscopy for *Brucella* identification, spectral profiles of seven different *Brucella* spp. and genetically closely related pathogens (nine species), which are well known as typical microbial cross-reactants and milk contaminants, were obtained and analyzed more deeply by the chemometric methods LDA and SVM.

Initially, we took into account whether identification of *Brucella* prepared on nutrient agar plates was possible, whereas variances of the spectra between different genera should also be evaluated. Also, we tried to discriminate *Brucella* to the species level. Finally, the spectroscopic procedure was evaluated for the detection and differentiation of *Brucella* spp. in milk.

**Identification of *Brucella* prepared on agar plates.** Since micro-Raman spectroscopy should be verified as a reliable identification tool for *Brucella* from the medium, we obtained Raman spectra for single microbial cells from seven *Brucella* spp., two strains of *Escherichia*, four strains of *Ochrobactrum*, five species of *Pseudomonas*, and two strains of *Yersinia*. A database was created, including 2,610 Raman spectra, to build up a classification model. Further, 1,151 Raman spectra of independently cultivated and measured bacterial samples were compiled as an identification set to be identified by the classification model.

On the basis of the spectral information, which needed to be analyzed, it is important to find a good classification algorithm. Since in the literature it has been reported that no single classifier

Meisel et al.

TABLE 2 Results of LDA and SVM calculations: database "medium"<sup>a</sup>

Genus	LDA						SVM					
	Classification data			Identification data			Classification data			Identification data		
	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec
<i>Brucella</i>	980/1048	93.5	94.8	368/380	96.8	92.4	1044/1048	99.6	98.5	369/380	97.1	92.8
<i>Escherichia</i>	212/215	98.6	99.6	101/106	95.3	99.8	214/215	99.5	99.9	94/106	88.8	99.8
<i>Ochrobactrum</i>	347/410	84.6	96.9	153/210	72.9	97.9	393/410	95.9	99.8	162/210	77.1	97.9
<i>Pseudomonas</i>	600/636	94.3	98.7	284/305	93.1	97.0	627/636	98.6	99.9	283/305	92.8	98.0
<i>Yersinia</i>	285/301	94.7	100	139/150	92.7	100	301/301	100	100	149/150	99.3	100

<sup>a</sup> For the database "medium," the values of true positives (TP) against all class members (CM) for classification and identification data are given as the results of LDA and SVM calculations (sensitivity, Sens; specificity, Spec).

is best for all problems and no classifier is always better than another one (39), we decided to perform a comparative study of two known algorithms practicable for bacterial discrimination (46, 54).

In order to validate the SVM performance, an LDA was also performed on the Raman spectra. A feature-reduction step was carried out using PCA before passing the data into the classification algorithm (LDA). The number of principal components used was 88. An overall accuracy of 92.9% was obtained, i.e., 2,424 of 2,610 Raman spectra were classified correctly. When the resulting classification model was applied to the identification set, 90.8% (1,045/1,151 spectra) of the spectra were assigned to the correct class. The outcomes are summarized in Table 2. The maximum sensitivity was obtained for the Raman spectra of *Brucella* spp. (96.8%), whereby the genetically closely related *Ochrobactrum* species showed the lowest accuracy (72.9%), since only 153 of 210 Raman spectra were identified accurately. Most of the incorrectly labeled spectra were put into the *Brucella* class (see Table SA2 in the supplemental material).

For classification by means of SVM, a radial basis function was applied to the data. The results for this calculation are listed in Table 2 and also, in greater detail, in Table SA3 in the supplemental material. From 2,610 Raman spectra, 2,579 spectra were classified correctly (98.8%). The average recognition rate for the validation data was 91.8% (1,057/1,151 spectra). Although the sensitivity of *Ochrobactrum* was increased to 77.1% compared to the results of the LDA, misidentifications as *Brucella* and *Pseudomonas* were still not avoidable. Consequently, the specificity of the *Brucella* class (92.8%) is lower compared than that of the other classes. The Raman spectra of *Escherichia* were assigned with a correctness of 88.8%. In contrast to this, identification of *Yersinia* resulted in high sensitivities (99.3%) and specificities (100%).

To assess whether overfitting is problematic and to test whether a sample type yet unknown to the classification model of the database "medium" could be handled, six *Brucella* biovar samples (*B. abortus* biovar 3, *B. abortus* biovar 4, *B. melitensis* biovar 2, *B. melitensis* biovar 3, and two different isolates of *B. suis* biovar 2) were independently prepared in the same way as the other species. In summary, 324 Raman spectra on the single-cell level were obtained and labeled by the LDA classification model. In this way, 94.8% (307/324 Raman spectra) were correctly labeled as *Brucella*, while misclassified spectra were mainly labeled as *Pseudomonas*. In Table 3 the results are summarized on a subspecies level: the samplewise rates ranged from 90.0% (*B. suis* biovar 2) to 100% (*B. abortus* biovar 4). Applying SVM to these data generated similar results: 82.0% for *B. suis* biovar 2 to 100% for *B. melitensis* biovar 2 (data not shown).

**Significant spectral variations.** To analyze the spectral variations between the different genera, each of the four classes (*Escherichia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, and *Yersinia*) was classified in a two-class approach against the *Brucella* class by means of LDA based on the classification data of the database "medium." In this context, four classifications were performed using five principal components, since >98% of the spectral information of all samples was taken into account with this number of principal components. Afterward, the LDA factor loadings of the wavenumbers were calculated and compared to the mean spectra of the classification data (Fig. 1). Independent of each classification, bands with negative loading vector values were assigned as a marker band of the *Brucella* spectra, whereas peaks with positive values were associated with the mean spectra of the other class. The band assignment was performed as described previously (24, 32).

While investigating spectral variations between *Escherichia* (line a) and *Brucella* (line b), shown in Fig. 1A, the loading vector (line c) indicates that some small signal variations were responsible for discrimination. *Brucella* spectra are differentiated by the higher signal intensities for DNA bands at 781 cm<sup>-1</sup> (cytosine or uracil) and 1,578 cm<sup>-1</sup> (guanine), cytochrome bands at 748, 1,130, and 1,578 cm<sup>-1</sup>, and peaks at 1,440 cm<sup>-1</sup> (proteins), 2,850 cm<sup>-1</sup> (lipids and fatty acids), and 2,900 cm<sup>-1</sup> (lipids and proteins) assigned to the C—H vibrations. *Escherichia*, on the other hand, is separated by a number of bands, which can be predominantly assigned to protein signals (1,208, 1,230, 1,269, 1,293, and 1,675 cm<sup>-1</sup>). In addition, the signals for RNA structures at 815 cm<sup>-1</sup> and for DNA at 1,327 cm<sup>-1</sup> appear in the spectrum of *Escherichia* compared to the *Brucella* spectrum.

As a result of the loading vector (line c) in Fig. 1B, the discrimination of *Brucella* (line b) and *Ochrobactrum* (line a) is based on some significant protein and DNA signals. According to that the

TABLE 3 LDA identification results for *Brucella* biovar samples not implemented in the database

Strain	Spectra labeled as <i>Brucella</i>	% Sens <sup>a</sup>	Misidentification(s) (no. of spectra)
<i>B. abortus</i> biovar 3	63/66	95.5	<i>Escherichia</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (2)
<i>B. abortus</i> biovar 4	39/39	100	
<i>B. melitensis</i> biovar 2	57/59	96.6	<i>Pseudomonas</i> (2)
<i>B. melitensis</i> biovar 3	53/56	94.6	<i>Ochrobactrum</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (2)
<i>B. suis</i> biovar 2	45/50	90.0	<i>Pseudomonas</i> (5)
	50/54	92.6	<i>Pseudomonas</i> (4)

<sup>a</sup> Sens, sensitivity.

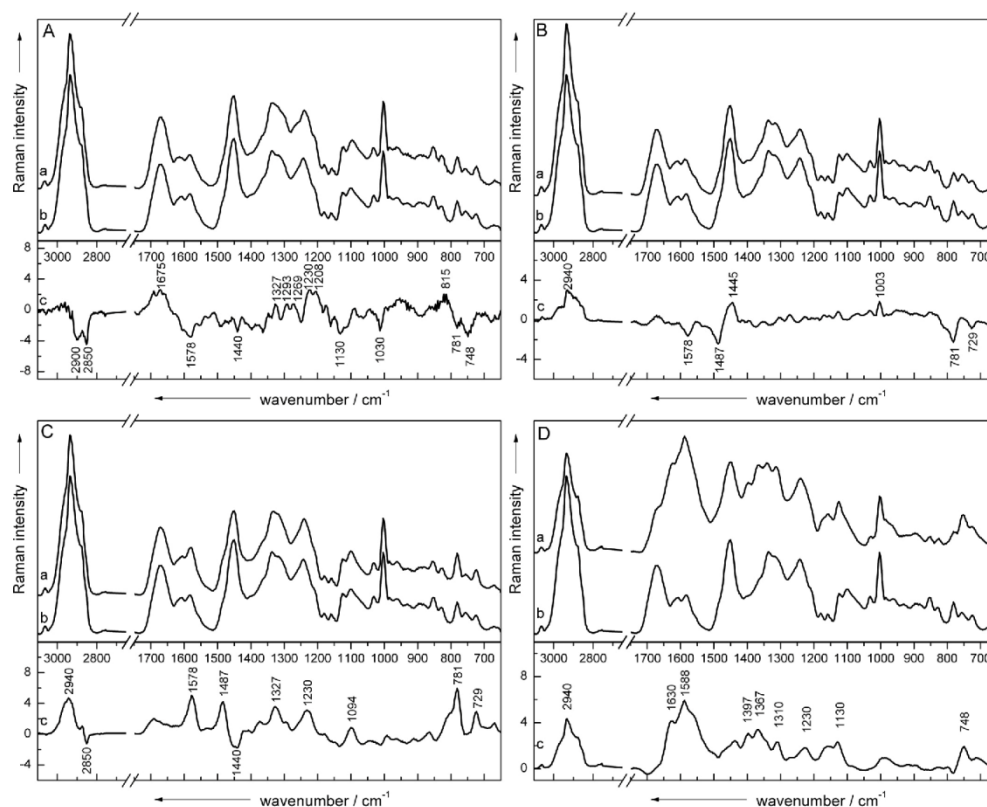


FIG 1 The mean spectra of *Brucella* spp. (Ab, Bb, Cb, and Db) from media were compared to the mean spectra of *Escherichia* (Aa), *Ochrobactrum* (Ba), *Pseudomonas* (Ca), and *Yersinia* (Da) spp. isolated from medium by calculating the loading vector (Ac, Bc, Cc, and Dc) of a two-class LDA with five PCs.

spectra of *Ochrobactrum* exhibit increased bands for phenylalanine ( $1,003\text{ cm}^{-1}$ ), the  $\text{CH}_2$  deformation vibration for proteins ( $1,448\text{ cm}^{-1}$ ), and the C—H stretching region at  $2,940\text{ cm}^{-1}$ , whereas typical DNA bands at  $729\text{ cm}^{-1}$  (adenine),  $781\text{ cm}^{-1}$  (cytosine or uracil), and  $1,487$  and  $1,578\text{ cm}^{-1}$  (guanine) are stronger in the spectra of *Brucella*.

When considering the *Pseudomonas* (Fig. 1C, line a) versus the *Brucella* (line b) class, it is obvious that most of the spectral variations occurring in the loading vector (line c) are assignable to *Pseudomonas*. Thus far, almost all typical DNA signatures ( $729$ ,  $781$ ,  $1,094$ ,  $1,327$ ,  $1,487$ , and  $1,578\text{ cm}^{-1}$ ) and, in addition, the amide III band ( $1,230\text{ cm}^{-1}$ ) and the C—H vibration ( $2,940\text{ cm}^{-1}$ ) appear to be enhanced compared to the mean spectrum of *Brucella*. Only lipid signals such as the  $\text{CH}_2$  vibration at  $2,850\text{ cm}^{-1}$  and the  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  deformation vibration at  $1,440\text{ cm}^{-1}$  are slightly increased in the spectra of *Brucella*.

In Fig. 1D, the spectrum of *Yersinia* (line a) was compared to that of *Brucella* (line b). Recognizably, the mean spectra differ

totally from each other. Thus, the separation criteria for these two classes are clearly given by the specific bands of *Yersinia*, which is also verified by the calculated loading vector (line c). The spectrum represents peaks from DNA, proteins, lipids, and possibly a cytochrome at  $748\text{ cm}^{-1}$  (DNA, cytochrome),  $1,130\text{ cm}^{-1}$  (fatty acids, cytochrome),  $1,230\text{ cm}^{-1}$  (amide III),  $1,310\text{ cm}^{-1}$  (lipids),  $1,367\text{ cm}^{-1}$  (phospholipids),  $1,397\text{ cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  deformation),  $1,588\text{ cm}^{-1}$  (phenylalanine),  $1,630\text{ cm}^{-1}$  (amide I), and  $2,940\text{ cm}^{-1}$  (lipids and proteins).

**Discrimination of *Brucella* species.** In Fig. 2, the mean spectra of *B. abortus* (line a), *B. canis* (line b), *B. ceti* (line c), *B. melitensis* (line d), *B. microti* (line e), *B. pinnipedialis* (line f), and *B. suis* (line g) are shown, where all essential microbial bands can be recognized. However, spectral variations between the different species are not obvious at first sight. The Raman spectra seem to be highly homogeneous, which is why chemometric analysis have to be applied to the data.

To investigate the discrimination and identification potential



Meisel et al.

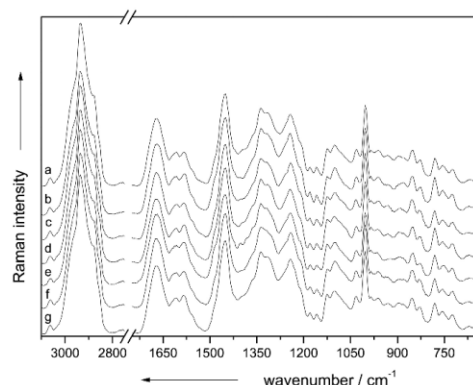


FIG 2 Mean spectra were calculated from ~100 background-corrected single-cell spectra of each investigated strain isolated from agar plates (*B. abortus* [line a], *B. canis* [line b], *B. ceti* [line c], *B. melitensis* [line d], *B. microti* [line e], *B. pinnipedialis* [line f], and *B. suis* [line g]) and are shown to highlight the close similarity of the spectra. The spectra are vertically shifted for clarity.

of Raman spectroscopy for *Brucella* on the species level, LDA and SVM were performed on the spectra of all investigated *Brucella* spp., which were cultivated on nutrient agar and inactivated by means of formalin treatment. Approximately 150 spectra of three batches of each species were used to set up a classification model, whereas a fourth independent batch was applied for validation.

Table 4 summarizes the results of the LDA. An overall accuracy of 85.7% was obtained for the classification using 86 principal components for dimension reduction. Although specificities >94% were observable for all species, only the sensitivity of *B. microti* was 94.4%. Among the other six species, the sensitivities varied from 75.0% for *B. melitensis* to 87.7% for *B. abortus*. *B. melitensis* was often misclassified as *B. abortus* and vice versa.

By rotating the identification data in the same spectral space of the classification data and performing an LDA afterward, an overall accuracy of 79.6% was calculated. Again, specificities of >93% for each species were obtained, and the sensitivities were between 60.0% (*B. ceti*) and 91.8% (*B. canis*). Thus, *B. ceti* was often labeled as *B. pinnipedialis* (10/53 spectra) and *B. suis* (10/53 spectra), while *B. microti* was mainly misidentified as *B. abortus* (8/78 spec-

tra). More-detailed confusion matrices are given in the Table SA6 in the supplemental material.

The same spectra were classified by means of a SVM using a radial kernel with an accuracy of 99.4% and an identification rate of 83.0%, as shown in Table 4. Although the classification was promising, since sensitivities of >96% and specificities of >99% for each species were calculated, the validation data were predicted only slightly better than with the LDA. Again, noteworthy inter-species misidentification was recognized similar to the analysis via the LDA. For example, some spectra of *B. suis* (8/53 spectra) and of *B. microti* (7/78 spectra) were often labeled as *B. melitensis*, whereas the sensitivities of both species (*B. suis*, 75.5%; *B. microti*, 74.4%) were considerably low. Also, the overlapping of *B. pinnipedialis* (9/53 spectra) and *B. ceti* (4/60 spectra) is worth mentioning. Instead, the identification rate of *B. canis* (95.9%) was increased in comparison to the LDA (see Table SA7 in the supplemental material).

**Detection of *Brucella* from milk samples.** Since the results for identifying inactivated *Brucella* under standard laboratory conditions were promising, we used this approach for real-world samples. Hence, milk samples were spiked with the pathogens and analyzed after 1 day of storage. The prepared milk samples were inactivated by the described procedure. The resulting resuspended biomass was used to gather single-cell Raman spectra, which were collected in a second database “milk.” In summary, 3,218 Raman spectra were measured and divided in classification (2,140 Raman spectra) and identification data (1,078 Raman spectra). Again, the spectra were statistically analyzed: the results of the LDA and SVM are given in Table 5 and more detailed in Tables SA4 and SA5 in the supplemental material.

The scores of 67 PCs were introduced in the data algorithm of the LDA. As a result, an overall accuracy of 92.5% was obtained for the classification data set, and the validation of the milk bacteria achieved almost the same rate (92.4%). Compared to the LDA results for the database “medium,” misidentification between *Brucella* (92.6% sensitivity) and *Ochrobactrum* (84.8% sensitivity) again appeared, whereas the discrimination of *Yersinia* (93.3% sensitivity) from *Brucella* was not problematic. Interestingly, the results could be improved when SVM was used. For the classification model data, the sensitivities varied from 94.6% (*Ochrobactrum*) to 99.5% (*Escherichia*), and the specificities were between 98.3% (*Brucella*) and 99.9% (*Yersinia*). Only 54 of 2,140 Raman spectra were misclassified (97.5%). Upon analyzing the results for the identification data, an overall accuracy of 95.8%

TABLE 4 Discrimination results of the spectroscopic data from *Brucella* at the species level<sup>a</sup>

Strain	LDA						SVM					
	Classification data			Identification data			Classification data			Identification data		
	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec
<i>B. abortus</i>	135/154	87.7	95.5	34/41	82.9	95.0	154/154	100	99.4	36/41	87.8	95.2
<i>B. canis</i>	121/141	85.8	98.8	67/73	91.8	95.8	141/142	100	100	70/73	95.9	96.3
<i>B. ceti</i>	72/88	81.8	99.8	36/60	60.0	97.6	88/88	100	100	53/60	88.3	96.9
<i>B. melitensis</i>	111/148	75.0	96.7	34/43	79.1	95.9	143/148	96.6	100	33/43	76.7	94.9
<i>B. microti</i>	202/214	94.4	97.4	63/78	80.8	98.1	214/214	100	99.9	58/78	74.4	99.6
<i>B. pinnipedialis</i>	115/132	87.1	94.9	43/53	81.1	95.5	131/132	99.2	100	43/53	81.1	98.6
<i>B. suis</i>	124/150	82.7	97.7	42/53	79.2	93.6	150/150	100	100	40/53	75.5	95.8

<sup>a</sup> The results include all species-specific sensitivities (Sens) and specificities (Spec) obtained by performing an LDA and SVM on model and validation data.

TABLE 5 Results of LDA and SVM calculations: database "milk"<sup>a</sup>

Genus	LDA						SVM					
	Classification data			Identification data			Classification data			Identification data		
	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec	TP/CM	% Sens	% Spec
<i>Brucella</i>	583/624	93.4	96.3	325/351	92.6	96.3	615/624	98.6	98.3	330/351	94.0	98.4
<i>Escherichia</i>	199/205	97.1	99.7	100/102	98.0	99.1	204/205	99.5	99.7	102/102	100	99.6
<i>Ochrobactrum</i>	352/425	82.8	96.8	173/204	84.8	96.8	402/425	94.6	99.1	191/204	93.6	97.9
<i>Pseudomonas</i>	640/656	97.6	98.3	300/316	94.9	99.2	645/656	98.3	99.6	309/316	97.8	99.3
<i>Yersinia</i>	206/230	89.6	99.0	98/105	93.3	98.7	220/230	95.7	99.9	101/105	96.2	99.4

<sup>a</sup> For the database "milk," the values of true positives (TP) against all class members (CM) for model and validation data are given as results of LDA and SVM calculations (sensitivity, Sens; specificity, Spec).

(1,033/1,078 Raman spectra) was calculated. Although *Brucella* could be identified with a 94.0% sensitivity, even the spectra of *Ochrobactrum* were assigned correctly with a 93.6% sensitivity. The sensitivities of the other milk contaminants were up to 100% (*Escherichia*, 100%; *Pseudomonas*, 97.8%; and *Yersinia*, 96.2%).

Based on this data set, the 624 Raman spectra of *Brucella* in milk were used to evaluate the discrimination potential on the species level by performing both LDA and SVM (data not shown). Identification rates of 75.0% (LDA, 15 principal components; classification accuracy, 82.5%) and 70.2% (SVM; classification accuracy, 95.7%) were achieved here.

## DISCUSSION

Although over 500,000 humans are infected by *Brucella* per year worldwide (57), the detection of the causative agents is still challenging. Diagnoses of brucellosis are currently based mainly on the cultivation of *Brucella*, on biochemical tests, or on classical serological methods, which often generate discordant results (4). In addition, these approaches bear a higher risk of infecting the personnel in the wake of their time-consuming and laborious character.

For this reason, more sophisticated techniques, such as PCR, are in development for clinical use that can be also performed directly on complex samples such as blood or milk (1, 41). However, the technique is not well established, since there is no standardization between the laboratories and sample preparation or the choice of target genes varies (60). As a consequence, PCR applications provide different sensitivities for *Brucella* identification. Furthermore, the detection is hampered by time-demanding precultivation or cost-intensive supplements. Therefore, we evaluated Raman spectroscopy as an identification tool for detecting *Brucella*.

Prior to the Raman spectroscopic measurements, the sample handling of pathogenic *Brucella* is simplified by a 1-h formalin inactivation step, which can be easily transferred to other organisms, such as *Ochrobactrum* or *Yersinia*, and can also be used directly for milk from which bacteria should be identified. This ensures more stable working safety, since bacteria are no longer infectious and so the risk of laboratory accidents is lowered. In addition, the inactivation procedure does not limit the subsequent analysis (47). Because we used milk spiked with  $10^7$  bacterial cells/ml of milk, no further isolation step has to be applied, since the bacterial biomass is concentrated during the inactivation process and afterward resuspended in distilled water to allow single cell measurements. Naturally, this high starting concentration was chosen to generate the high amount of the spectral data establish-

ing a comprehensive database but is presumably orders of magnitude higher than the detection limit of the method.

To detect contaminations in the range of  $\leq 10^3$  cells/ml of milk, it is necessary to apply an additional isolation step for the Raman spectroscopic analysis. In this context, Raman-compatible extraction techniques based on buoyant density centrifugation or enzymatic milk clearing, found in the literature, can be used (12, 21). Although these isolation techniques are accompanied by a loss of one order of magnitude of the bacterial start concentration, the recovered biomass is still enough to detect single microbial cells by means of micro-Raman spectroscopy. Similar extraction steps are also essential for PCR, too, which is certainly limited when dealing with bacteria directly in milk due to inhibitory effects (5).

By means of a micro-Raman spectroscopic approach, a wealth of single-cell Raman spectra of all prepared samples were collected. On the basis of this amount of spectral information, which needed to be analyzed, it is important to find a good ongoing classification algorithm. Since it is postulated that no classifier is always better than another one (39), we decided to perform a comparative study of SVM and LDA, which are two algorithms known to be useful in pattern recognition of bacterial samples.

LDA is a common applied method for linear supervised dimensionality reduction, which is used to find a lower dimensional space that best discriminates the samples from different classes. Instead, SVM is a powerful supervised learning algorithm based on the principle of maximal margin bound. The application of both methods to the same data sets allowed us to compare the differences in their performances depending on the way looking at the problem. Since the performance of both classifiers is comparable, we are going to discuss only the results of the best classification model in each case.

Discrimination and identification of *Brucella* from media against *Ochrobactrum* or *Yersinia*, the most common cross-reactants in other biochemical detection systems, worked out with >92% sensitivity by analysis via Raman spectroscopy and SVM. Even further accompanying background organisms in milk, which are represented by *Pseudomonas* and *Escherichia*, can be separated from the rest.

It could also be shown that also a various number of signal variations, which are responsible for the discrimination, occur when analyzing the loading vectors between *Brucella* and the other genera. *Escherichia* and *Brucella* mostly differ in the cytochrome content, which is one possible reason why misidentification between these two classes is pretty rare. The spectra of *Pseudomonas* show significantly higher protein and DNA signals compared to *Brucella*. The changes in the spectra are provoked due to variations

Meisel et al.

in the microbial composition and growth behavior of each genus. *Yersinia* shows a drastically changed Raman spectrum in comparison to the spectra of all other genera. Interestingly, the spectra of *Ochrobactrum* and *Brucella* show only few variations in DNA and protein bands. Conductively, misidentifications are more probable.

It has been reported that common biochemical identification routines are not reliable, since *Ochrobactrum* is often misidentified as *Brucella* and vice versa due to the high phenotypic and genotypic similarity between *Ochrobactrum* and *Brucella*, sharing 98.8% rRNA genes (10). Sensitivities in the range of 32 to 84% were reported for *Ochrobactrum anthropi* in APE 20NE systems, which encompassed also false identification of other genera such as *Pseudomonas* (50). We also obtained some misidentifications of *Ochrobactrum* as *Brucella* or *Pseudomonas* when using Raman spectroscopy. Thus, the identification rate of *Ochrobactrum* from culture media was reduced to 77%. Against this, the sensitivity for *Ochrobactrum* in milk is much higher (93.6%), which might be influenced by different adaptations and growth behaviors of the bacteria due to the different media.

Due to the high natural diversity of the genus *Brucella*, it was also imperative to test the classification model with several *Brucella* biovars, which were not implemented in the analysis before: the results ranging from 90 to 100% indicate that the method is stable enough to also identify reliably "unknown" *Brucella* sub-species at the genus level by using the LDA classifier.

By applying a combination of inactivation, Raman spectroscopy, and chemometrics to spiked milk samples, we can show that identification of *Brucella* in milk can be easily and rapidly ensured. Sensitivities in the range of 93.6 to 100% were obtained for all investigated genera applying SVM to the data.

Moreover, the discrimination potential of Raman spectroscopy for different *Brucella* species is a further concern in the present study. Although micro-Raman spectroscopy allows a satisfactory identification of the genus *Brucella*, the identification of independently prepared samples is less reliable for *Brucella* at the species level, since accuracies of only 83.0% from agar plates and 70.2% from milk were obtained, whereas the model operates with rates of >95.0%. One reason for this can be given by the fact that all *Brucella* spp. share >90% nucleic acid sequence homology (57). Also, other previously used techniques, such as PCR, have been partly hampered by these factors (60). In addition, the current internal taxonomy of *Brucella* is controversial, since it relies on a variety of biochemical, antigenic, and metabolic differences that are used simultaneously (22). Caused by this fact, detection of the single species could be limited, which is exemplified by an matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry study applied to six *Brucella* spp., with the result that 20.6% of the isolates were identified correctly (11).

Furthermore, the morphology of the species varies in the LPS composition due to spontaneous mutations, which directly influences the virulence of the bacteria. We took this fact into account by implementing only fully virulent and therefore smooth species, with the exception of *B. canis*, which appears naturally rough, but causes occasional infections in humans (44). Concluding, it is reasonable that *B. canis* can be identified with 95.6% sensitivity by means of SVM in comparison to the other species (sensitivities in the range of 74 to 88%). Even if the discrimination of *Brucella* spp. is still problematic, the availability of a method, which allows early identification of possible *Brucella* isolates independent of the LPS

composition on genus-level both for clinical and epidemiological reasons, is extremely useful.

This report indicates that micro-Raman spectroscopy in combination with SVM may offer a promising alternative to detect *Brucella* both from agar-plates and directly from milk. Measurements on the single-cell level are enabled and so a faster and more accurate identification within 2 h can be achieved while avoiding a precultivation step.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Funding of the research projects Pathosafe (FKZ 13N9547 and FKZ 13N9549) and RamaDek (FKZ 13N11168) from the Federal Ministry of Education and Research, Germany, and MikroPlex (PE 113-1) from the Thüringische Exzellenzinitiative is gratefully acknowledged.

We also thank Katja Fischer (Friedrich Loeffler Institute) for preparing the pathogenic organisms.

#### REFERENCES

- Al-Mariri A, Haj-Mahmoud N. 2010. Detection of *Brucella abortus* in bovine milk by polymerase chain reaction. *Acta Vet. Brno* 79:277–280.
- Amoroso MG, et al. 2011. Validation of a real-time PCR assay for fast and sensitive quantification of *Brucella* spp. in water buffalo milk. *Food Control* 22:1466–1470.
- Barham WB, Church P, Brown JE, Paparello S. 1993. Misidentification of *Brucella* species with use of rapid bacterial identification systems. *Clin. Infect. Dis.* 17:1068–1069.
- Batchelor BI, Brindle RJ, Gilks GF, Selkon JB. 1992. Biochemical misidentification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections. *J. Hosp. Infect.* 22:159–162.
- Bickley J, Short JK, McDowell DG, Parkes HC. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 22:153–158.
- Bocklitz T, et al. 2009. A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis. *J. Raman Spectrosc.* 40:1759–1765.
- Bocklitz T, Walter A, Hartmann K, Rösch P, Popp J. 2011. How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? *Anal. Chim. Acta* 704:47–56.
- Ciobotă V, et al. 2011. Influence of intracellular storage material on bacterial identification by means of Raman spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 397:2929–2937.
- Daly P, Collier T, Doyle S. 2002. PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 34:222–226.
- Elsaghir AAF, James EA. 2003. Misidentification of *Brucella melitensis* as *Ochrobactrum anthropi* by API 20NE. *J. Med. Microbiol.* 52:441–442.
- Ferreira L, et al. 2010. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF mass spectrometry: fast and reliable identification from agar plates and blood cultures. *PLoS One* 5:e14235. doi:10.1371/journal.pone.0014235.
- Fukushima H, Katsube K, Hata Y, Kishi R, Fujiwara S. 2007. Rapid separation and concentration of food-borne pathogens in food samples prior to quantification by viable-cell counting and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:92–100.
- Guihot A, Bossi P, Bricaire F. 2004. Bioterrorism with brucellosis. *Presse Med.* 33:119–122.
- Gutierrez J, Liebana J. 1993. Immunological methods for the detection of structural components and metabolites of bacteria and fungi in blood. *Ann. Biol. Clin.* 51:83–90.
- Harz M, et al. 2009. Direct analysis of clinical relevant single bacterial cells from cerebrospinal fluid during bacterial meningitis by means of micro-Raman spectroscopy. *J. Biophoton.* 2:70–80.
- Hutsebaut D, et al. 2004. Effect of culture conditions on the achievable taxonomic resolution of Raman spectroscopy disclosed by three *Bacillus* species. *Anal. Chem.* 76:6274–6281.
- Kalasinsky KS, et al. 2007. Raman chemical imaging spectroscopy reagentless detection and identification of pathogens: signature development and evaluation. *Anal. Chem.* 79:2658–2673.
- Karatzoglou A, Meyer D, Hornik K. 2006. Support vector machines in R. *J. Stat. Software* 15:1–28.
- López-Góñi I, Moriyón I. 2004. *Brucella*: molecular and cellular biology. Horizon Bioscience, Norfolk, United Kingdom.



20. Maquelin K, et al. 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* 51:255–271.
21. Meisel S, Stöckel S, Elschner M, Rösch P, Popp J. 2011. Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk toward their compatibility with Raman spectroscopy. *Analyst* 136:4997–5005.
22. Moreno E, Cloeckert A, Moriyon I. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Vet. Microbiol.* 90:209–227.
23. Morhac M. 2009. An algorithm for determination of peak regions and baseline elimination in spectroscopic data. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. A* 600:478–487.
24. Movasaghi Z, Rehman S, Rehman IU. 2007. Raman spectroscopy of biological tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.* 42:493–541.
25. Naumann D. 2000. Infrared spectroscopy in microbiology, p 102–131. In Meyers RA (ed), *Encyclopedia of analytical chemistry*. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
26. Naumann D, Keller S, Helm D, Schultz C, Schrader B. 1995. FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the noninvasive characterization of intact microbial cells. *J. Mol. Struct.* 347:399–405.
27. Navarro E, Casao MA, Solera J. 2004. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4:115–123.
28. Nelson WH, Manoharan R, Sperry JF. 1992. UV resonance Raman studies of bacteria. *Appl. Spectrosc. Rev.* 27:67–124.
29. Ngo-Thi NA, Kirschner C, Naumann D. 2003. Characterization and identification of microorganisms by FIF-IR micro-spectrometry. *J. Mol. Struct.* 661:371–380.
30. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N. 2006. *Brucella* as a biological weapon. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:2229–2236.
31. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* 6:91–99.
32. Patzold R, et al. 2008. In situ mapping of nitrifiers and anammox bacteria in microbial aggregates by means of confocal resonance Raman microscopy. *J. Microbiol. Methods* 72:241–248.
33. Rees RK, Graves M, Caton N, Ely JM, Probert WS. 2009. Single tube identification and strain typing of *Brucella melitensis* by multiplex PCR. *J. Microbiol. Methods* 78:66–70.
34. R Foundation for Statistical Computing. 2008. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
35. Rösch P, et al. 2006. Identification of single eukaryotic cells with micro-Raman spectroscopy. *Biopolymers* 82:312–316.
36. Rösch P, et al. 2005. Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1626–1637.
37. Rossen L, Nørskov P, Holmström K, Rasmussen OF. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* 17:37–45.
38. Ryan CG, Clayton E, Griffin WL, Sie SH, Cousens DR. 1988. SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of pixel spectra in geosience applications. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B* 34:396–402.
39. Salzberg SL. 1997. On comparing classifiers: pitfalls to avoid and a recommended approach. *Data Mining Knowledge Disc.* 1:317–328.
40. Schmid U, et al. 2009. Gaussian mixture discriminant analysis for the single-cell differentiation of bacteria using micro-Raman spectroscopy. *Chemometrics Intell. Lab. Systems* 96:159–171.
41. Scholz HC, et al. 2008. Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium*, and *Brucella* spp. by a multi-primer PCR that targets the *recA* gene. *J. Med. Microbiol.* 57:64–71.
42. Schumacher W, Kühnert M, Rösch P, Popp J. 2011. Identification and classification of organic and inorganic components of particulate matter via Raman spectroscopy and chemometric approaches. *J. Raman Spectrosc.* 42:383–392.
43. Schuster KC, Urlaub E, Gapes JR. 2000. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J. Microbiol. Methods* 42:29–38.
44. Smith LD, Ficht TA. 1990. Pathogenesis of *Brucella*. *Crit. Rev. Microbiol.* 17:209–230.
45. Stöckel S, et al. 2009. Effect of supplementary manganese on the sporulation of *Bacillus* endospores analyzed by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* 40:1469–1477.
46. Stöckel S, Meisel S, Elschner M, Rösch P, Popp J. 2012. Raman spectroscopic detection of anthrax endospores in powder samples. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51:5339–5342.
47. Stöckel S, et al. 2010. Raman spectroscopy-compatible inactivation method for pathogenic endospores. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2895–2907.
48. Tarcea N, et al. 2007. UV Raman spectroscopy: a technique for biological and mineralogical in situ planetary studies. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 68:1029–1035.
49. Thirlwall RE, et al. 2008. Improving the specificity of immunodiagnosis for porcine brucellosis. *Vet. Res. Commun.* 32:209–213.
50. Thoma B, et al. 2009. Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. *Int. J. Med. Microbiol.* 299:209–220.
51. Tomaso H, et al. 2007. Einsatzrelevanz der PCR als diagnostisches Verfahren. *Wiener Klin. Wochens.* 119:26–32.
52. Vapnik V. 1995. The nature of statistical learning theory. Springer-Verlag, Inc, New York, NY.
53. Velasco J, et al. 1998. Evaluation of the relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum anthropi* and description of *Ochrobactrum intermedium* sp. nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:759–768.
54. Walter A, et al. 2011. Raman spectroscopic detection of physiology changes in plasmid-bearing *Escherichia coli* with or without antibiotic treatment. *Anal. Bioanal. Chem.* 400:2763–2773.
55. Wenning M, Buechl NR, Scherer S. 2010. Species and strain identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks. *J. Biophoton.* 3:493–505.
56. Wiedmann M, Weilmeyer D, Dineen SS, Ralyea R, Boor KJ. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2085–2095.
57. Winchell JM, Wolff BJ, Tiller R, Bowen MD, Hoffmaster AR. 2010. Rapid identification and discrimination of *Brucella* isolates by use of real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J. Clin. Microbiol.* 48:697–702.
58. Yagupsky P, Baron EJ. 2005. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1180–1185.
59. Young EJ, Corbel MJ. 1989. *Brucellosis: clinical and laboratory aspects*. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
60. Yu WL, Nielsen K. 2010. Review of detection of *Brucella* spp. by polymerase chain reaction. *Croatian Med. J.* 51:306–313.

# Raman spectroscopy as potential tool to detect *Brucella* from milk

## [Supplementary Information]

Susann Meisel<sup>1</sup>, Stephan Stöckel<sup>1</sup>, Mandy Elschner<sup>2</sup>, Falk Melzer<sup>2</sup>, Petra Rösch<sup>1\*</sup> and Jürgen Popp<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, Friedrich Schiller University Jena, Helmholtzweg 4, 07743 Jena.

<sup>2</sup> Friedrich Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Bacterial Infections and Zoonoses, Naumburger Straße 96a, 07743 Jena.

<sup>3</sup> Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, 07745 Jena.

**Tab. S1:** Number of spectra used for classification or identification of each genus for both databases

	no. of spectra			
	medium		milk	
	classification	identification	classification	identification
<i>Brucella</i>	1048	380	624	351
<i>Escherichia</i>	215	106	205	102
<i>Ochrobactrum</i>	410	210	425	204
<i>Pseudomonas</i>	636	305	656	316
<i>Yersinia</i>	301	150	230	105
$\Sigma$ of all spectra	2610	1151	2140	1078
	<b>3761</b>		<b>3218</b>	



**Tab. S2:** LDA results for classification and identification of the database “medium” are given as confusion matrix including all genus-specific sensitivities (sens) and specificities (spec).

Predicted	True															
	Model data								Validation data							
	B	E	O	P	Y	sens %	spec %		B	E	O	P	Y	sens %	spec %	
<i>Brucella</i> (B)	<b>980</b>	1	54	21	6	93.5	94.8		<b>368</b>	2	47	10	0	96.8	92.4	
<i>Escherichia</i> (E)	4	<b>212</b>	4	1	0	98.6	99.6		0	<b>101</b>	1	1	0	95.3	99.8	
<i>Ochrobactrum</i> (O)	54	1	<b>347</b>	13	0	84.6	96.9		8	2	<b>153</b>	10	0	72.9	97.9	
<i>Pseudomonas</i> (P)	10	1	5	<b>600</b>	10	94.3	98.7		4	1	9	<b>284</b>	11	93.1	97.0	
<i>Yersinia</i> (Y)	0	0	0	1	<b>285</b>	94.7	100		0	0	0	0	<b>139</b>	92.7	100	

**Tab. S3:** SVM results for model and validation data of the database “medium” are shown as confusion matrix including all genus-specific sensitivities (sens) and specificities (spec).

Predicted	True															
	Model data								Validation data							
	B	E	O	P	Y	sens %	spec %		B	E	O	P	Y	sens %	spec %	
<i>Brucella</i> (B)	<b>1044</b>	0	16	8	0	99.6	98.5		<b>369</b>	3	38	14	0	97.1	92.8	
<i>Escherichia</i> (E)	0	<b>214</b>	1	0	0	99.5	99.9		1	<b>94</b>	1	0	0	88.8	99.8	
<i>Ochrobactrum</i> (O)	3	0	<b>393</b>	1	0	95.9	99.8		9	3	<b>162</b>	8	0	77.1	97.9	
<i>Pseudomonas</i> (P)	1	1	0	<b>627</b>	0	98.6	99.9		1	6	9	<b>283</b>	1	92.8	98.0	
<i>Yersinia</i> (Y)	0	0	0	0	<b>301</b>	100	100		0	0	0	0	<b>149</b>	99.3	100	

2

**Tab. S4:** LDA results for classification and identification of the database “milk” are given as confusion matrix including all genus-specific sensitivities (sens) and specificities (spec).

Predicted	True															
	Model data								Validation data							
	B	E	O	P	Y	sens %	spec %		B	E	O	P	Y	sens %	spec %	
<i>Brucella</i> (B)	<b>583</b>	0	41	5	10	93.4	96.3		<b>325</b>	0	19	5	3	92.6	96.3	
<i>Escherichia</i> (E)	0	<b>199</b>	0	4	1	97.1	99.7		0	<b>100</b>	0	9	0	98.0	99.1	
<i>Ochrobactrum</i> (O)	32	5	<b>352</b>	7	11	82.8	96.8		22	1	<b>173</b>	2	3	84.8	96.8	
<i>Pseudomonas</i> (P)	6	1	16	<b>640</b>	2	97.6	98.3		3	1	1	<b>300</b>	1	94.9	99.2	
<i>Yersinia</i> (Y)	3	0	16	0	<b>206</b>	89.6	99.0		1	0	11	0	<b>98</b>	93.3	98.7	

**Tab. S5:** SVM results for model and validation data of the database “milk” are shown as confusion matrix including all genus-specific sensitivities (sens) and specificities (spec).

Predicted	True															
	Model data								Validation data							
	B	E	O	P	Y	sens %	spec %		B	E	O	P	Y	sens %	spec %	
<i>Brucella</i> (B)	<b>615</b>	0	18	2	6	98.6	98.3		<b>330</b>	0	9	1	2	94.0	98.4	
<i>Escherichia</i> (E)	0	<b>204</b>	0	5	0	99.5	99.7		0	<b>102</b>	0	4	0	100	99.6	
<i>Ochrobactrum</i> (O)	8	0	<b>402</b>	4	4	94.6	99.1		14	0	<b>191</b>	2	2	93.6	97.9	
<i>Pseudomonas</i> (P)	1	1	4	<b>645</b>	0	98.3	99.6		5	0	0	<b>309</b>	0	97.8	99.3	
<i>Yersinia</i> (Y)	0	0	1	0	<b>220</b>	95.7	99.9		2	0	4	0	<b>101</b>	96.2	99.4	

3

**Tab. S6:** Discrimination results for *B. abortus* (Babo), *B. canis* (Bcan), *B. melitensis* (Bmel), *B. microti* (Bmic), *B. pinnipedialis* (Bpin) and *B. suis* (Bsui) including all species-specific sensitivities (sens) and specificities (spec) by performing a LDA on model and validation data.

Predicted	True (86PCs)																	
	Model data									Validation data								
	Babo	Bcan	Bcet	Bmel	Bmic	Bpin	Bsui	sens %	spec %	Babo	Bcan	Bcet	Bmel	Bmic	Bpin	Bsui	sens %	spec %
Babo	<b>135</b>	2	0	28	0	0	5	87.7	95.5	<b>34</b>	0	4	1	8	0	2	82.9	95.0
Bcan	2	<b>121</b>	0	1	3	3	0	85.8	98.8	4	<b>67</b>	0	0	3	3	1	91.8	95.8
Bcet	0	0	<b>72</b>	0	0	2	0	81.8	99.8	0	0	<b>36</b>	0	0	7	0	60.0	97.6
Bmel	16	0	1	<b>111</b>	0	3	6	75.0	96.7	3	1	0	<b>34</b>	3	0	5	79.1	95.9
Bmic	0	11	0	1	<b>202</b>	3	3	94.4	97.4	0	5	0	0	<b>63</b>	0	0	80.8	98.1
Bpin	1	7	12	4	5	<b>115</b>	12	87.1	94.9	0	0	10	0	0	<b>43</b>	3	81.1	95.5
Bsui	0	0	3	3	4	6	<b>124</b>	82.7	97.9	0	0	10	8	1	0	<b>42</b>	79.3	93.6

4

**Tab. S7:** Discrimination results for *B. abortus* (Babo), *B. canis* (Bcan), *B. melitensis* (Bmel), *B. microti* (Bmic), *B. pinnipedialis* (Bpin) and *B. suis* (Bsui) including all species-specific sensitivities (sens) and specificities (spec) by performing a SVM on model and validation data.

Predicted	True (cost=5, gamma=0.0007)																	
	Model data									Validation data								
	Babo	Bcan	Bcet	Bmel	Bmic	Bpin	Bsui	sens %	spec %	Babo	Bcan	Bcet	Bmel	Bmic	Bpin	Bsui	sens %	spec %
Babo	<b>154</b>	0	0	5	0	0	0	100	99.4	<b>36</b>	2	1	3	5	0	4	87.8	95.2
Bcan	0	<b>141</b>	0	0	0	0	0	100	100	2	<b>70</b>	0	0	8	0	0	95.9	96.3
Bcet	0	0	<b>88</b>	0	0	0	0	100	100	0	0	<b>53</b>	0	0	9	0	88.3	96.9
Bmel	0	0	0	<b>143</b>	0	0	0	96.6	100	0	1	0	<b>33</b>	7	0	8	76.7	94.9
Bmic	0	0	0	0	<b>214</b>	1	0	100	99.9	0	0	0	0	<b>58</b>	0	1	74.4	99.6
Bpin	0	0	0	0	0	<b>131</b>	0	99.2	100	0	0	4	0	0	<b>43</b>	0	81.1	98.6
Bsui	0	0	0	0	0	0	<b>150</b>	100	100	3	0	2	7	0	1	<b>40</b>	75.5	95.8

5

## 2.4 Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy

[SM4]

Susann Meisel	Kultivierung und Aufarbeitung der Bakterien Raman-mikrospektroskopische Messungen Datenanalyse und -auswertung Erstellung des Manuskriptes
Stephan Stöckel	Datenanalyse und -auswertung Revision und Überarbeitung des Skriptes
Petra Rösch	Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts
Jürgen Popp	Projektleitung Konzept- und Ergebnisdiskussion Revision und Überarbeitung des Manuskripts

*Food Microbiology* **2014**, 38, 36-43.

Der Nachdruck der folgenden Publikation erscheint mit freundlicher Genehmigung von  
*Elsevier*.



## Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy



Susann Meisel<sup>a</sup>, Stephan Stöckel<sup>a</sup>, Petra Rösch<sup>a,\*</sup>, Jürgen Popp<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, University of Jena, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Germany

<sup>b</sup> Institute of Photonic Technology, Albert-Einstein-Straße 9, D-07745 Jena, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 April 2013

Received in revised form

17 July 2013

Accepted 14 August 2013

Available online 22 August 2013

#### Keywords:

Food-borne pathogens

Raman microspectroscopy

Support vector machine

Three level classification model

Minced beef

Chicken breast

### ABSTRACT

The development of fast and reliable sensing techniques to detect food-borne microorganisms is a permanent concern in food industry and health care. For this reason, Raman microspectroscopy was applied to rapidly detect pathogens in meat, which could be a promising supplement to currently established methods.

In this context, a spectral database of 19 species of the most important harmful and non-pathogenic bacteria associated with meat and poultry was established. To create a meat-like environment the microbial species were prepared on three different agar types.

The whole amount of Raman data was taken as a basis to build up a three level classification model by means of support vector machines. Subsequent to a first classifier that differentiates between Raman spectra of Gram-positive and Gram-negative bacteria, two decision knots regarding bacterial genus and species follow. The different steps of the classification model achieved accuracies in the range of 90.6%–99.5%. This database was then challenged with independently prepared test samples. By doing so, beef and poultry samples were spiked with different pathogens associated with food-borne diseases and then identified. The test samples were correctly assigned to their genus and for the most part down to the species-level i.e. a differentiation from closely-related non-pathogenic members was achieved.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The presence of bacteria in food is natural and unavoidable (Mandal et al., 2011). While some of these bacteria are involved in spoilage processes, like *Pseudomonas* spp. (Doulgeraki et al., 2012; Gram et al., 2002; Liu et al., 2006), other bacteria are harmful to humans. Meat and poultry provide a good nutrient source for the growth of microorganisms in particular for pathogens like *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* or *Yersinia enterocolitica*, due to high water activity and the presence of proteins and carbohydrates (Naidoo and Lindsay, 2010; Nicolaou et al., 2012). These pathogens can cause gastrointestinal human diseases after consumption of undercooked or raw meat products (Mandal et al., 2011).

Since food-borne illnesses are a permanent problem for public health, rapid and reliable detection systems for spoilage and

pathogenic microorganisms in meat products are required (Velusamy et al., 2010). Food-borne outbreaks, like e.g. the *E. coli* outbreak in Germany 2011 (Abu Sin et al., 2013; Krause et al., 2013), exemplify the need for fast and accurate identification systems for contaminated food.

Conventional identification methods based on a pre-enrichment by bacterial cultivation with specific cultivation media are laborious and time-consuming before a reliable identification result is reached (Roda et al., 2012). To reduce the analysis time various sophisticated methods, like bioluminescence or staining procedures (Junillon et al., 2012; Karoui and Blecker, 2011), immunological methods (Amoako et al., 2012; Zhao et al., 2009), nucleic acid based techniques (Garrido et al., 2013; Kawasaki et al., 2012; Kim et al., 2007), biosensors (Byrne et al., 2009; Pedrero et al., 2009; Velusamy et al., 2010), bioimaging (Kemper et al., 2013; Khlebtsov et al., 2013; Lin et al., 2012) or mass spectrometry (Nicolaou et al., 2012) were evaluated. While some of these methods mainly determine the cell quantity, others require pre-cultivation steps, complicated separation techniques or cost-intensive materials.

Vibrational spectroscopic approaches (IR absorption and Raman spectroscopy) have shown their great potential to rapidly identify

\* Corresponding authors. Institute of Physical Chemistry and Abbe Center of Photonics, University of Jena, Helmholtzweg 4, D-07743 Jena, Germany.

E-mail addresses: [petra.roesch@uni-jena.de](mailto:petra.roesch@uni-jena.de) (P. Rösch), [juergen.popp@uni-jena.de](mailto:juergen.popp@uni-jena.de) (J. Popp).

**Table 1**

List of used bacteria, abbreviations, number of spectra in the database, standard deviation of means (SDM) per species and numbering of the independent identification samples from blood agar (BA), minced beef (beef) and chicken breast (chicken).

Genus	Species	Strain	Source <sup>a</sup>	Abbr.	No. of spectra	SDM	Independent identification samples		
							BA	Beef	Chicken
<i>Escherichia</i> (3)	<i>E. coli</i>	DSMZ 501	DSMZ	Ecol1	128	0.13			
	<i>E. coli</i>	DSMZ 10806	DSMZ	Ecol2	281		#1	#2	
	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	ATCC	Ecol3	120				
<i>Listeria</i> (5)	<i>L. innocua</i>	DSMZ 20649	DSMZ	Linn	202	0.16			
	<i>L. grayi</i>	DSMZ 20601	DSMZ	Lgra	175	0.14			
	<i>L. monocytogenes</i>	DSMZ 20600	DSMZ	Lmon1	191	0.15			
	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC BAA-751	DSMZ	Lmon2	267		#3		#4
	<i>L. welshimeri</i>	DSMZ 20650	DSMZ	Lwel	172	0.15			
<i>Pseudomonas</i> (3)	<i>P. aeruginosa</i>	DSMZ 50071	DSMZ	Paer	193	0.18	#5	#6	
	<i>P. putida</i>	DSMZ 291	DSMZ	Pput	226	0.12			
	<i>P. stutzeri</i>	DSMZ 5190	DSMZ	Pstu	223	0.15			
<i>Salmonella</i> (2)	<i>S. enterica</i>	DSMZ 17058	DSMZ	Sent	163	0.12			
	<i>S. typhimurium</i>	HS/STS-TSF	IMM	Styp	282		#7		#8
<i>Staphylococcus</i> (3)	<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	DSMZ	Saur	286	0.14	#9	#10	
	<i>S. cohnii</i>	DSMZ 20261	DSMZ	Scoh	202	0.14			
	<i>S. epidermidis</i>	DSMZ 3270	DSMZ	Sepi	153	0.14			
<i>Yersinia</i> (8)	<i>Y. aldovae</i>	DSMZ 18303	DSMZ	Yald	171	0.13			
	<i>Y. bercovieri</i>	DSMZ 18528	DSMZ	Yber	170	0.14			
	<i>Y. enterocolitica</i>	HS/RKIW/03	IMM	Yent03	213	0.14			
	<i>Y. enterocolitica</i>	DSMZ 4780	DSMZ	Yent08	132				
	<i>Y. enterocolitica</i>	HS/RKIW/09	IMM	Yent09	185		#11		#12
	<i>Y. mollaretii</i>	DSMZ 18520	DSMZ	Ymol	181	0.13			
	<i>Y. rohdei</i>	DSMZ 18270	DSMZ	Yroh	188	0.12			
	<i>Y. ruckeri</i>	DSMZ 18506	DSMZ	Yruc	118	0.13			

<sup>a</sup> DSMZ (German Collection of microorganisms and cells); ATCC (American Type Culture Collection); IMM (Institute of Medical Microbiology).

microorganisms even if they are embedded in complex matrices (Alexandrakis et al., 2008; Amamcharla et al., 2010; Ammor et al., 2009; Argyri et al., 2010; Davis et al., 2010; Ellis et al., 2004; Gaus et al., 2006; Maquelin et al., 2002; Tarcea et al., 2007; Walter et al., 2011). Especially Raman microspectroscopy with Raman excitation wavelengths in the visible wavelength region is a very promising method to detect microorganisms on a single-cell level with minimal sample preparation. Thus, by applying single-cell Raman microspectroscopy the time-consuming pre-cultivation step can be avoided and therefore the detection process of microorganisms is significantly accelerated (Harz et al., 2009). In doing so, the bacterial Raman spectra are classified or identified by applying innovative chemometric approaches like e.g. discriminant analysis or support vector machines (Bocklitz et al., 2009; Meisel et al., 2012; Rösch et al., 2005; Schmid et al., 2009; Stöckel et al., 2012b).

Here we utilized Raman microspectroscopy in combination with chemometrics to detect food-borne pathogens from spiked meat and poultry products. Therefore we constructed in a first step a Raman spectra database consisting of 19 different species (24 strains), including the most important food-borne pathogens *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *Salmonella* spp., *S. aureus* or *Y. enterocolitica* as well as closely-related non-pathogenic representatives of the same genera. Recently we have shown that besides the right choice of bacterial representatives also the preparation of the microorganisms is crucial to establish a reliable Raman database. In other words, Raman databases, which contain Raman data of bacteria cultivated under different conditions, allow for a more sufficient and reliable identification of real-world samples (Meisel et al., 2012). Therefore the microorganisms were prepared on three different meat-like media: Columbia blood agar, which is a standard agar for microbial clinical purposes, brain heart infusion agar (main ingredients: beef heart and calf brain infusions) and Müller–Hinton agar (main ingredient: beef infusion). Afterwards a three level classification model – including the spectral variations of the different species and nutrient sources – was developed to

subsequently validate the database with bacterial test samples directly from meat and poultry. In this context, pieces of minced beef and chicken breast were spiked with pathogenic microorganisms. In order to separate the target bacteria from the complex structured meat surface for the Raman spectroscopic measurements an additional isolation and concentration procedure was applied.

## 2. Material and methods

### 2.1. Species and strains used

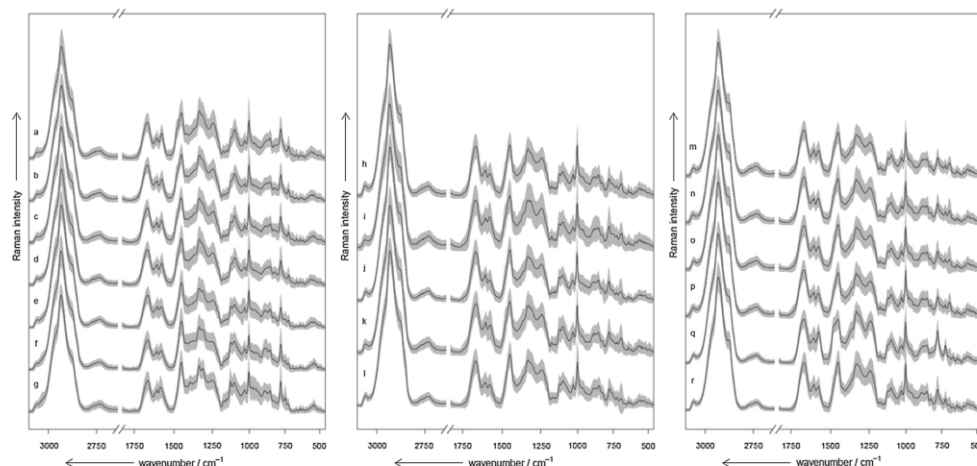
An overview of the species and strains used throughout this study is provided in Table 1. Most of the non-pathogenic strains were obtained from the German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH, Braunschweig, Germany (DSMZ) and American Type Culture Collection (ATCC). All pathogenic and a few non-pathogenic strains were provided by the Institute of Medical Microbiology, Jena, Germany (IMM).

The data collection encompasses Gram-positive (five *Listeria* spp. and three *Staphylococcus* spp.) as well as Gram-negative representatives (two *Salmonella enterica* type strains, eight *Yersinia* spp., three *Pseudomonas* spp. and three *E. coli* type strains).

### 2.2. Sample preparation

To design a Raman database of meat pathogens, all species were cultivated on three different media mainly consisting of meat ingredients. To account for the biological variability, at least four independently cultivated batches of each species were prepared.

The bacterial species were prepared on Columbia blood agar (BA), brain heart infusion agar (BHI) and Müller–Hinton agar (MHA). The compositions of the cultivation media are as follows: (1) BA consists of a Columbia blood agar base and 5% sheep blood. (2) BHI includes beef heart (5 g/l), calf brains (12.5 g/l) and some



**Fig. 1.** Mean Raman spectra and double standard deviation depicted as grey corona of all analysed microbial species: (a) *L. grayi* (Lgra), (b) *L. innocua* (Linn), (c) *L. monocytogenes* (Lmon), (d) *L. welshimeri* (Lwel), (e) *S. aureus* (Saur), (f) *S. cohnii* (Scoh), (g) *S. epidermidis* (Sepi), (h) *E. coli* (Ecol), (i) *P. aeruginosa* (Paer), (j) *P. putida* (Pput), (k) *P. stutzeri* (Pstu), (l) *S. enterica* (Sent + Styp), (m) *Y. aldyovae* (Yald), (n) *Y. bercovieri* (Yber), (o) *Y. enterocolitica* (Yent), (p) *Y. mollaretii* (Ymol), (q) *Y. rohdei* (Yroh), (r) *Y. ruckeri* (Yruc).

supplements as disodium hydrogen phosphate (2.5 g/l), D(+)-glucose (2 g/l) and peptone (10 g/l). (3) In Müller–Hinton agar the following ingredients are implemented: beef infusion solids (2.0 g/l), starch (1.5 g/l) and Casein hydrolysate (17.5 g/l).

After 24 h at 37 °C incubator temperature, the resulting colonies were rinsed off the plates and washed two times with distilled water: the bacterial solution was centrifuged (microcentrifuge MiniSpin plus, Eppendorf, Germany) at 6708 g for 90 s and subsequently the pellet was resuspended in one millilitre of distilled water. Overall bacterial suspensions with a concentration of  $\sim 10^7$  cells per millilitre were produced. For the Raman spectroscopic measurements one microlitre of the solution was smeared on a nickel foil and air-dried.

### 2.3. Isolation process out of the meat samples

We used commercially available fresh vacuum-packaged minced beef and chicken breast to prepare the meat identification samples: 2-g-pieces of the minced beef (beef) or chicken breast (chicken) were spiked with one millilitre of a bacterial solution with a concentration of  $\sim 10^7$  cells per millilitre, which were cultivated on blood agar for 24 h at 37 °C before. These meat samples were stored in a refrigerator at  $\sim 4$  °C for 24 h to let the bacteria adapt to the new matrix. Afterwards the bacteria were recovered from the meat pieces by floating them with 5 ml distilled water and shaking for 10 min in a rotator. Afterwards the resulting meat juice was gathered from the meat pieces and was filtrated with a 5  $\mu$ m sterile filter to remove meat residues. The filtrate was centrifuged at 6708 g for 3 min, the supernatant was discarded and the pellet was washed twice. For that purpose, the pellet was suspended in 1 ml distilled water and centrifuged at 6708 g for 90 s and at last again resuspended in 1 ml distilled water. Finally, for the Raman spectroscopic measurements 5  $\mu$ l of the resulting solution were smeared on a nickel foil. By doing so, three samples for each kind of meat were prepared.

### 2.4. Spectroscopic instrumentation

All of the Raman spectra were collected under ambient conditions. The Raman spectroscopic measurements were carried out with a Raman microscopic device (BioParticleExplorer, rap.ID Particle Systems GmbH, Berlin, Germany) that allows automated measurements of single-cell Raman spectra with an excitation light of 532 nm provided by a frequency-doubled Nd:YAG laser (LCMS-111-NNP25, Laser-export Co. Ltd.). An Olympus MPLFLN 100  $\times$  BD objective focused the Raman excitation light onto the sample with a spot size of  $<1$   $\mu$ m and approximately 7 mW. The integration time per Raman spectrum ( $70$ – $3319$   $\text{cm}^{-1}$ ) was 15 s. After blocking of the Rayleigh scattered light by two edge filters, the  $180^\circ$  back-scattered Raman light was spectrally dispersed by a single-stage monochromator (HE 532, Horiba Jobin Yvon) equipped with a 920 lines/mm grating and collected with a thermoelectrically cooled charge-coupled device camera (DV401-BV, Andor Technology). The spectral resolution was ca.  $10$   $\text{cm}^{-1}$ . One Raman spectrum of each cell was automatically recorded after 7.5 s and one after 15 s. These two were afterwards compared for cosmic spike removal.

### 2.5. Multivariate analysis

Gnu R was used for the statistical analyses (R. Development-Core-Team, 2008). The analysis procedure mainly consisted of three steps: pre-processing, training of the self-learning machines to build a model, and validation (Bocklitz et al., 2011). The pre-processing of every data set was always the same. First, the background of the spectra and cosmic spikes were removed. The background was stripped off by employing a statistics-sensitive nonlinear iterative peak clipping algorithm (SNIP) (Ryan et al., 1988), which is in principle a composite of a low statistics filter and a peak-clipping algorithm. A fourth-order-algorithm with a clipping window of seven was applied to generate an individual background for each spectrum, which was then subtracted from the corresponding original Raman spectrum. Because of their origin,



the cosmic spikes are neither correlated in time nor in space and could therefore be localized by recording two subsequent Raman spectra of the same bacterial cell. Intensity differences for each channel and their standard deviation were calculated to locate the spikes in the channels, where the intensity difference exceeded twice the standard deviation. Afterwards the single cell Raman spectra were wavenumber-calibrated using acetaminophen as standard. The wavenumber regions  $639\text{--}1802\text{ cm}^{-1}$  and  $2783\text{--}3186\text{ cm}^{-1}$  were used for the multivariate analysis. A further pre-processing step was normalization: Each spectrum was divided by its area, which was calculated as the Euclidean distance of the spectrum to the zero-spectrum. New sets of spectra were always pre-processed the same way.

An unsupervised hierarchical cluster analysis (HCA) was performed to the data using the squared Euclidean distance and Ward algorithm.

A support vector machine (SVM) as supervised classifier was chosen to evaluate the spectral data set (Vapnik, 1995) and a radial kernel function to map the data in a different space. While the cost values are fixed to 1, the optimization of the value gamma was performed via grid search and allows some flexibility in separating the classes to create a more accurate classification model.

The classification model was ongoing validated with independent test samples from culture and spiked meat simulating realistic conditions.

### 3. Results and discussion

In order to rapidly and easily detect microbial contaminations in meat products via Raman microspectroscopy, Raman spectral profiles of 18 different microbial species (24 strains) were collected and analysed to build up an elaborate database.

To account for the natural environment of meat, the investigated microbial species were prepared on three different media: Columbia blood agar (BA), brain heart infusion agar (BHI) and Müller–Hinton agar (MHA), all containing meat ingredients. Furthermore, Raman spectra of bacteria from more than four independently prepared batches of each species were recorded. Fig. 1 displays mean Raman spectra of the bacterial species used to build up the database. These mean Raman spectra were calculated from all Raman spectra of one species within the database (listed in Table 1), so that all parameters (three different media and more than four independent batches) are included. To determine the variations within the Raman spectra of one species, the double standard deviation for each mean spectrum is added as grey corona to the mean spectra shown in Fig. 1. In addition, the normalized standard deviation has been calculated for each species. Thus, the standard deviation per channel is put into relation of a mean spectrum's statistical property (standard deviation of the channel means) (Stöckel et al., 2012a). The standard deviation means (SDM) are given in Table 1, where low SDM values represent low channel-wise variabilities and thus a high reproducibility of the data set. High numbers in the range of nearly 1 indicate high fluctuations per channel and question the liability of the data. However, all calculated SDMs are significantly lower than 1 and lie in an interval between 0.12 and 0.18, showing that the observed Raman information does not largely depend on the different cultivation conditions. Consequently, the mean Raman data can be used to create a classification system.

In a first step we performed a HCA to organize the spectra according to intra-spectral similarities. Since HCA is a non-hypothesis technique, it does not pay any attention to the underlying classes. Thus, all average spectra of the 24 strains were fed into the algorithm in an unprejudiced way. The HCA analysis shows that the average Raman spectra can be divided into two groups (see dendrogram

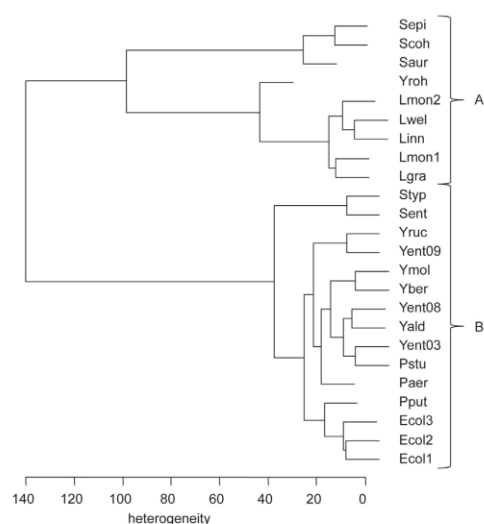


Fig. 2. HCA resulting dendrogram of the average spectra from all analysed species. Euclidian Metric and Ward's Algorithm as Clustering Method were used.

shown in Fig. 2): While block A contains the spectra of all *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Yersinia rohdei* (Yroh), block B pools together the spectra of *E. coli* type strains, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. and all other *Yersinia* spp. With only one exception (Yroh) the HCA apparently clusters the species in Gram-positive (group A) and Gram-negative (group B) species. Since the results coincide with taxonomic considerations, it can be assumed that taxonomic relationships are reflected in Raman-spectral features.

Based on this HCA analysis, a three level classification approach was established, which is schematically depicted in Fig. 3: In a first step the complete pre-processed spectral training data (4622 spectra) were fed into a Top-Level-classifier to classify between Gram-positive and Gram-negative bacteria. For that purpose a SVM with a radial kernel was applied and the crucial kernel parameters, cost and gamma, were determined by optimization towards a maximum predictive ability. The validation of the database spectra showed that 99.5% of the data were correctly assigned to the Gram-positive ('Gram+') or Gram-negative ('Gram-') group. The second level of the classification tree subdivides the Raman spectra into the respective genera before a separation on a species-level was carried out in a third step. The classifier 'Gram+' was trained with 1648 Raman spectra to differentiate between *Listeria* and *Staphylococcus*. The training data were correctly assigned to their respective genera with an accuracy of 97.2%. Ongoing, 2760 out of 2974 Raman spectra (92.8%) were accurately labelled by the 'Gram-' classifier to *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* or *Yersinia*. In the last step, SVMs were calculated with adapted kernel parameters to distinguish between the single species. The achieved accuracies on a species-level were determined as follows: *Listeria* spp. (94.7%), *Staphylococcus* spp. (100%), *E. coli* type strains (95.8%), *Pseudomonas* spp. (99.4%), *Salmonella* spp. (98.9%) and *Yersinia* spp. (90.6%).

In order to identify meat-borne pathogens, 12 independent identification samples were prepared. Six of these originated from Columbia blood agar (BA), three from spiked minced beef (beef) and three from spiked chicken breast (chicken). The agar-based

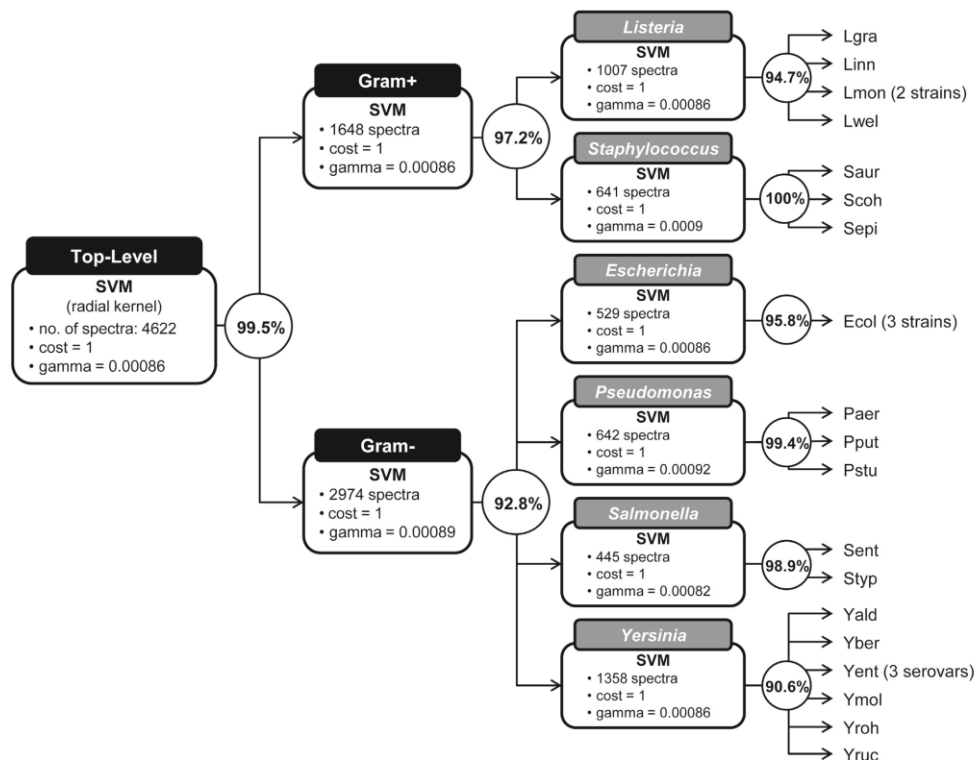


Fig. 3. Structure and parameters of the classification tree on basis of the built database.

bacterial identification samples should assess the general ability to identify Raman spectra of samples, which were prepared in the same way as the training data, and to test the robustness of the classification model itself. In contrast, the bacteria from meat and poultry account for real-world-samples. All information about the identification samples and their characteristics are summarized in the last columns of Table 1. Right after the isolation and concentrating procedure, the test samples were Raman spectroscopically measured. At least a minimum number of 30 single cells per sample were measured to get a well-founded prediction. Further, the test data were pre-processed by the same procedure applied for the training data.

Each Raman spectrum of the 12 test samples was interrogated three times during the identification process: First, the spectrum was analysed concerning a categorization into the Gram-positive or Gram-negative group. Thereafter an assignment to one of the genera and ultimately to one of the species was performed. All of these decisions were done sample-wise, i.e. the class to which the majority of the spectra of a sample were assigned to, was defined as class of the whole sample. Table 2 summarizes all these results for each validation step and for each sample: Top-Level, Genus-Level or Species-Level.

The Top-Level classifier labelled all identification samples (#1 to #12) correctly as 'Gram+' or 'Gram-' with an overall accuracy of

99.2%. All test samples, except sample #4 (91.1%), were classified without any misallocations, i.e. the samples #1, #2, #5, #6, #7, #8, #11, #12 were correctly categorized as Gram-negative bacteria, whereas samples #3, #4, #9, #10 were classified as Gram-positive bacteria.

In the second classification step, the spectra of samples assigned to 'Gram+' were evaluated regarding to their affiliation to *Listeria* or *Staphylococcus*, while the others, which passed the branch 'Gram-', were assigned to *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* or *Yersinia*. The results of this second classification step are visualized in Fig. 4. The graph shows that in each test sample one genus dominates: Sample #1 was categorized as *Escherichia* with an accuracy of 85.3% (29/34 Raman spectra), while some of the spectra were assigned to *Pseudomonas* (2/34, 5.9%), *Salmonella* (2/34, 5.9%) or *Yersinia* (1/34, 2.9%); sample #2 was labelled as *Escherichia* with 82.6% and again misclassifications occurred for 7 of 46 Raman spectra as *Pseudomonas* (4/46, 10.9%) and *Salmonella* (3/46, 6.5%). In contrast, all Raman spectra (42/42, 100%) of sample #3 were identified as *Listeria*. Samples #5 and sample #6 were recognized as Gram-negative *Pseudomonas* with an accuracy of 100%. Sample #4 was assigned to the Gram-positive *Listeria* (97.8%) where only one spectrum was misidentified as *Staphylococcus*. Furthermore, for sample #7 (100% *Salmonella*) and sample #8 (93.1% *Salmonella*, 6.9% *Escherichia*) most of the spectra fell into the class *Salmonella*, while



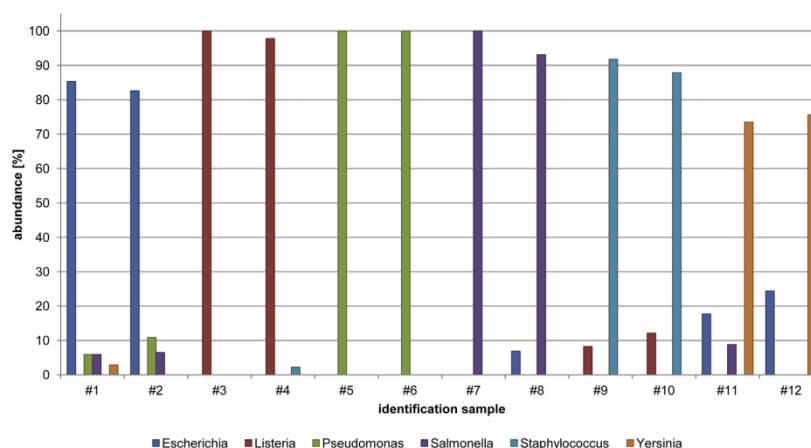
**Table 2**  
Results of the identification samples passing the classification tree step by step.

Sample	Class	Medium	Top-level				Genus-level			Species-level
			Gram-	Gram+	Sensitivity	Assigned to	TP/all	Sensitivity	Assigned to	Assigned to
#1	Ecol2	Blood agar	34	0	100%	Gram–	29/34	85.3%	<i>Escherichia</i>	<b>Ecol2</b> (100%)
#2	Ecol2	Beef	46	0	100%	Gram–	38/46	82.6%	<i>Escherichia</i>	<b>Ecol2</b> (100%)
#3	Lmon2	Blood agar	0	42	100%	Gram+	42/42	100%	<i>Listeria</i>	<b>Lmon</b> (100%)
#4	Lmon2	Chicken	4	41	91.1%	Gram+	44/45	97.8%	<i>Listeria</i>	<b>Lmon</b> (100%)
#5	Paer	Blood agar	35	0	100%	Gram–	50/50	100%	<i>Pseudomonas</i>	Pstu (46.0%) Pput (40.0%) <b>Paer</b> (14.0%)
#6	Paer	Beef	48	0	100%	Gram–	48/48	100%	<i>Pseudomonas</i>	Pput (54.2%) <b>Paer</b> (25.0%) Pstu (20.8%)
#7	Styp	Blood agar	31	0	100%	Gram–	31/31	100%	<i>Salmonella</i>	<b>Styp</b> (100%)
#8	Styp	Chicken	29	0	100%	Gram–	27/29	93.1%	<i>Salmonella</i>	<b>Styp</b> (100%)
#9	Saur	Blood agar	0	49	100%	Gram+	45/49	91.8%	<i>Staphylococcus</i>	<b>Saur</b> (89.8%) Scoh (10.2%)
#10	Saur	Beef	0	33	100%	Gram+	29/33	87.9%	<i>Staphylococcus</i>	<b>Saur</b> (100%)
#11	Yent09	Blood agar	34	0	100%	Gram–	25/34	73.5%	<i>Yersinia</i>	<b>Yent</b> (97.1%) Yber (2.9%)
#12	Yent09	Chicken	45	0	100%	Gram–	34/45	75.6%	<i>Yersinia</i>	<b>Yent</b> (97.8%) Yroh (2.2%)

sample #9 (91.8% *Staphylococcus*, 8.2% *Listeria*) and sample #10 (87.9% *Staphylococcus*, 12.1% *Listeria*) were labelled as *Staphylococcus*. Finally, sample #11 as well as sample #12 were identified as *Yersinia* with an accuracy of 73.5% (#11) and 75.6% (#12), respectively. Their major misclassifications can be assigned to *Escherichia* (#11, 17.7%; #12, 21.4%) and *Salmonella* (#11, 8.8%).

To summarize, both classifiers worked out well with an overall abundance of 81.7%. All test samples were correctly identified on the genus level. Thereby neither the adapted isolation procedure nor the test medium from which the test samples originated played a significant role. Thus, the meat matrix did not impair the outcome of the identification procedure. Based on these results we attempted to identify the samples even further on a species-level or in case of *E. coli* on strain-level. The respective SVM classifiers were challenged with the twelve test samples and the results are summarized in the most right column of Table 2. All test samples – except sample #5 and #6 – were clearly associated to one species. The samples #1 (*E. coli* DSMZ 10806), #2 (*E. coli* DSMZ 10806), #3 (*L. monocytogenes*), #4 (*L. monocytogenes*), #7 (*Salmonella typhimurium*), #8 (*S. typhimurium*) and #10 (*S. aureus*) were correctly

assigned with an accuracy of 100%. Sample #9 was identified as *S. aureus* with an accuracy of 89.8%, only 10.2% of the Raman spectra (5/49) were labelled as *Staphylococcus cohnii*. Samples #11 and #12 were correctly assigned to *Y. enterocolitica* (**Yent**) with accuracies of 73.5% (#11) and 75.6% (#12). The misclassified spectra were recognized as *Yersinia bercovieri* (#11) or *Y. rohdei* (#12). Only in case of samples #5 and #6 no explicit result on the species-level was obtained. Here, the spectra were distributed over all of the three *Pseudomonas* species classes, i.e. 46.0% of the Raman spectra from sample #5 were assigned to *Pseudomonas stutzeri* (**Pstu**), 40.0% to *Pseudomonas putida* (**Pput**) and only 14.0% to the true-class *P. aeruginosa* (**Paer**). Similar results were obtained for sample #6: 54.2% as *P. putida* (**Pput**), 25.0% as *P. aeruginosa* (**Paer**) and 20.8% as *P. stutzeri* (**Pstu**). These results show that the model was obviously not able to clearly recognize both samples as *P. aeruginosa* no matter from which matrix they have been isolated. This is probably due to the well-known high metabolic diversity of this very species (Kirisits et al., 2005; Kung et al., 2010; Mathee et al., 2008). The high SDM value of *P. aeruginosa* (SDM 0.18) as compared to the other species (see Table 1) as well as the standard deviation of the mean



**Fig. 4.** Results for the Raman spectra of the identification samples on genus-level. The corresponding absolute number of spectra is given in Table 2.

spectrum shown in Fig. 1(i) reflects this fact. To increase the identification potential of the underlying model the biodiversity of *P. aeruginosa* has to be taken into account by considering Raman spectra of e.g. other strains or a higher variety of cultivation conditions.

#### 4. Conclusion

It could be shown that meat associated microorganisms can be detected by a combination of Raman microspectroscopy and chemometrics. Thereby the most important representatives of food-borne pathogens, like *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus* and *Y. enterocolitica*, were identified after isolation from artificially contaminated minced beef or chicken breast by a three level classification model based on support vector machines. In this context, first, the spectral data were affiliated to Gram-positive or Gram-negative bacteria, second, the genus was determined and third an assignment on a species-level or strain-level followed. Sufficiently high accuracies were achieved at all three steps: 99.2% of the spectra were correctly labelled as 'Gram+' or 'Gram-', the assignment on the genus-level achieved accuracies in the range of 73.5% and 100%, whereas all test samples – except *P. aeruginosa* – were truly identified on the species-level with sensitivities in the range of 89.8% (# 9, Saur) and 100% (#3, Lmon; #4 Lmon; #7 Styp, #8 Styp, #10 Saur).

The whole identification process requires a timeframe of circa two hours including sample preparation and Raman spectroscopic analyses. Thereby the method is qualified as a rapid screening tool in comparison to established methods.

For this reason, the results of the proof-of-principle concept are promising to aspire the identification of real-world-samples. To isolate also very low concentrations of microbial meat contamination the isolation process is extendable with a buoyant density centrifugation step. This isolation procedure allows to concentrate small amounts of bacteria out of complex matrices, like milk or meat. Therefore no additional pre-enrichment step is necessary. Furthermore, the extraction method proved to be Raman-compatible (Meisel et al., 2011). Since Raman microspectroscopy enables the detection of single bacterial cells, the analysis of environmental samples with mixed populations of bacteria will be targeted in further studies.

#### Acknowledgement

Funding of the research project RamaDek (FKZ 13N11168) from the Federal Ministry of Education and Research, Germany is gratefully acknowledged. We also thank Svea Sachse (Institute of Medical Microbiology, University of Jena) for helping with the sample preparation.

#### References

- Abu Sin, M., Takla, A., Flieger, A., Prager, R., Fruth, A., Tietze, E., Fink, E., Korte, J., Schink, S., Hoehle, M., Eckmanns, T., 2013. Carrier prevalence, secondary household transmission, and long-term shedding in 2 districts during the *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany, 2011. *J. Infect. Dis.* 207, 432–438.
- Alexandrakis, D., Downey, G., Scannell, A.G.M., 2008. Detection and identification of bacteria in an isolated system with near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3431–3437.
- Amamcharla, J.K., Panigrahi, S., Logue, C.M., Marchello, M., Sherwood, J.S., 2010. Application of vapour-phase Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and statistical feature selection methods for identifying *Salmonella enterica* typhimurium contamination in beef. *Biosyst. Eng.* 107, 1–9.
- Ammor, M.S., Argyri, A., Nychas, G.J.E., 2009. Rapid monitoring of the spoilage of minced beef stored under conventionally and active packaging conditions using Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with chemometrics. *Meat Sci.* 81, 507–514.
- Amoako, K.K., Shields, M.J., Goji, N., Paquet, C., Thomas, M.C., Janzen, T.W., Bin Kingombe, C.L., Kell, A.J., Hahn, K.R., 2012. Rapid detection and identification of *Yersinia pestis* from food using immunomagnetic separation and pyrosequencing. *J. Pathog.* 2012, 781652–781652.
- Argyri, A.A., Panagou, E.Z., Tarantilis, P.A., Polysiou, M., Nychas, G.J.E., 2010. Rapid qualitative and quantitative detection of beef fillets spoilage based on Fourier transform infrared spectroscopy data and artificial neural networks. *Sens. Actuators B Chem.* 145, 146–154.
- Bocklitz, T., Putsche, M., Stüber, C., Käs, J., Niendorf, A., Rösch, P., Popp, J., 2009. A comprehensive study of classification methods for medical diagnosis. *J. Raman Spectrosc.* 40, 1759–1765.
- Bocklitz, T., Walter, A., Hartmann, K., Rösch, P., Popp, J., 2011. How to pre-process Raman spectra for reliable and stable models? *Anal. Chim. Acta* 704, 47–56.
- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N., O'Kennedy, R., 2009. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors* 9, 4407–4445.
- Davis, R., Burgula, Y., Deering, A., Irudayaraj, J., Reuhs, B.L., Mauer, L.J., 2010. Detection and differentiation of live and heat-treated *Salmonella enterica* serovars inoculated onto chicken breast using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *J. Appl. Microbiol.* 109, 2019–2031.
- Douglarakis, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.-J.E., 2012. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int. J. Food. Microbiol.* 157, 130–141.
- Ellis, D.I., Broadhurst, D., Goodacre, R., 2004. Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of beef by Fourier transform infrared spectroscopy and machine learning. *Anal. Chim. Acta* 514, 193–201.
- Garrido, A., Chapela, M.-J., Roman, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J.M., Cabado, A.G., 2013. A new multiplex real-time PCR developed method for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* detection in food and environmental samples. *Food Control* 30, 76–85.
- Gaus, K., Rösch, P., Petry, R., Peschke, K.D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Baumann, K., Popp, J., 2006. Classification of lactic acid bacteria with UV-resonance Raman spectroscopy. *Biopolymers* 82, 286–290.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M., 2002. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 78, 79–97.
- Harz, A., Rösch, P., Popp, J., 2009. Vibrational spectroscopy – a powerful tool for the rapid identification of microbial cells at the single-cell level. *Cytom. Part A* 75A, 104–113.
- Junillon, T., Vimont, A., Mosticone, D., Mallen, B., Baril, F., Rozand, C., Flandrois, J.-P., 2012. Simplified detection of food-borne pathogens: an in situ high affinity capture and staining concept. *J. Microbiol. Methods* 91, 501–505.
- Karoui, R., Blecker, C., 2011. Fluorescence spectroscopy measurement for quality assessment of food systems – a review. *Food Bioprocess Technol.* 4, 364–386.
- Kawasaki, S., Kusano, K., Arai, R., Komeda, T., Kamisaki-Horikoshi, N., Kawamoto, S., 2012. Multiplex PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in processed foods using TA10 simultaneous growth broth. *J. Food Agr. Environ.* 10, 261–266.
- Kemper, B., Barroso, Á., Woerdemann, M., Dewenter, L., Vollmer, A., Schubert, R., Mellmann, A., von Bally, G., Denz, C., 2013. Towards 3D modelling and imaging of infection scenarios at the single cell level using holographic optical tweezers and digital holographic microscopy. *J. Biophotonics* 6, 260–266.
- Khlebtsov, B.N., Tuchina, E.S., Khanadeev, V.A., Panfilova, E.V., Petrov, P.O., Tuchin, V.V., Khlebtsov, N.G., 2013. Enhanced photoinactivation of *Staphylococcus aureus* with nanocomposites containing plasmonic particles and hematoporphyrin. *J. Biophotonics* 6, 338–351.
- Kim, J.S., Lee, G.G., Park, J.S., Jung, Y.H., Kwak, H.S., Kim, S.B., Nam, Y.S., Kwon, S.-T., 2007. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Food Prot.* 70, 1656–1662.
- Kirisits, M.J., Prost, L., Starkey, M., Parsek, M.R., 2005. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4809–4821.
- Krause, G., Frank, C., Gilsdorf, A., Mielke, M., Schaade, L., Stark, K., Burger, R., 2013. The 2011 HUS epidemic in Germany: challenges for disease control: what should be improved? *Bundesgesundhbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 56, 56–66.
- Kung, V.L., Ozer, E.A., Hauser, A.R., 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 621–641.
- Lin, Y.-C., Perevedentseva, E., Tsai, L.-W., Wu, K.-T., Cheng, C.-L., 2012. Nanodiamond for intracellular imaging in the microorganisms in vivo. *J. Biophotonics* 5, 838–847.
- Liu, F., Guo, Y.-z., Li, Y.-f., 2006. Interactions of microorganisms during natural spoilage of pork at 5 °C. *J. Food Eng.* 72, 24–29.
- Mandal, P.K., Biswas, A.K., Choi, K., Pal, U.K., 2011. Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview. *Am. J. Food Technol.* 6, 87–102.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., van den Braak, N., Endtz, H.P., Naumann, D., Puppels, G.J., 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J. Microbiol. Methods* 51, 255–271.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., Olavarrieta, R., Doud, M., Smith, R.S., Montgomery, P., White, J.R., Godfrey, P.A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J.E., Lory, S., 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3100–3105.
- Meisel, S., Ströckel, S., Eischner, M., Melzer, F., Rösch, P., Popp, J., 2012. Raman spectroscopy as a potential tool for detection of *Brucella* spp. in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5575–5583.

- Naidoo, K., Lindsay, D., 2010. Survival of *Listeria monocytogenes*, and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pasteurii*, during two types of biltong-manufacturing processes. *Food Control* 21, 1042–1050.
- Nicolau, N., Xu, Y., Goodacre, R., 2012. Detection and quantification of bacterial spoilage in milk and pork meat using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis. *Anal. Chem.* 84, 5951–5958.
- Pedrero, M., Campuzano, S., Pingarron, J.M., 2009. Electroanalytical Sensors and devices for multiplexed detection of foodborne pathogen microorganisms. *Sensors* 9, 5503–5520.
- R. Development-Core-Team, 2008. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Roda, A., Mirasoli, M., Roda, B., Bonvicini, F., Colliva, C., Reschiglian, P., 2012. Recent developments in rapid multiplexed bioanalytical methods for foodborne pathogenic bacteria detection. *Microchim. Acta* 178, 7–28.
- Rösch, P., Harz, M., Schmitt, M., Peschke, K.D., Ronneberger, O., Burkhardt, H., Motzkus, H.W., Lankers, M., Hofer, S., Thiele, H., Popp, J., 2005. Chemotaxonomic identification of single bacteria by micro-Raman spectroscopy: application to clean-room-relevant biological contaminations. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1626–1637.
- Ryan, C.G., Clayton, E., Griffin, W.L., Sie, S.H., Cousins, D.R., 1988. SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative-analysis of Pixe spectra in geoscience applications. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B* 34, 396–402.
- Schmid, U., Rösch, P., Krause, M., Harz, M., Popp, J., Baumann, K., 2009. Gaussian mixture discriminant analysis for the single-cell differentiation of bacteria using micro-Raman spectroscopy. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96, 159–171.
- Stöckel, S., Meisel, S., Elschner, M., Rösch, P., Popp, J., 2012a. Identification of *Bacillus anthracis* via Raman Spectroscopy and chemometric approaches. *Anal. Chem.* 84, 9873–9880.
- Stöckel, S., Meisel, S., Elschner, M., Rösch, P., Popp, J., 2012b. Raman spectroscopic detection of anthrax endospores in powder samples. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 5339–5342.
- Tarcea, N., Harz, M., Rösch, P., Frosch, T., Schmitt, M., Thiele, H., Hochleitner, R., Popp, J., 2007. UV Raman spectroscopy – a technique for biological and mineralogical in situ planetary studies. *Spectrochim. Acta A – Mol. Biomol. Spectrosc.* 68, 1029–1035.
- Vapnik, V., 1995. *The Nature of Statistical Learning Theory*. Springer-Verlag New York, Inc., New York, NY.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., Adley, C., 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. *Biotechnol. Adv.* 28, 232–254.
- Walter, A., März, A., Schumacher, W., Rösch, P., Popp, J., 2011. Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device. *Lab on a Chip* 11, 1013–1021.
- Zhao, Y., Ye, M., Chao, Q., Jia, N., Ge, Y., Shen, H., 2009. Simultaneous detection of multifood-borne pathogenic bacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation in food samples. *J. Agric. Food Chem.* 57, 517–524.



---

## Kapitel 3

### Publikationsliste

#### Referierte Veröffentlichungen

Susann Meisel, Stephan Stöckel, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Identification of meat-associated pathogens via Raman microspectroscopy**. Food Microbiology, 38, 36-43 (2014).

Stephan Stöckel, Susann Meisel, Mandy Elschner, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Identification of Bacillus anthracis via Raman spectroscopy and chemometric approaches**. Analytical Chemistry, 84, 9873-9880 (2012).

Susann Meisel, Stephan Stöckel, Mandy Elschner, Falk Melzer, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Raman spectroscopy as potential tool to detect Brucella from milk**. Applied and Environmental Microbiology, 78, 5575-5583 (2012).

Stephan Stöckel, Susann Meisel, Mandy Elschner, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Raman Spectroscopic Detection of Anthrax Endospores in Powder Samples**. Angewandte Chemie, 51, 5339-5342 (2012).

Susann Meisel, Stephan Stöckel, Mandy Elschner, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy**. Analyst, 136(23), 4997-5005 (2011).

Stephan Stöckel, Wilm Schumacher, Susann Meisel, Mandy Elschner, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Raman Spectroscopy Compatible Inactivation Method for Pathogenic Endospores**. Applied and Environmental Microbiology, 76(9), 2895-2907 (2010).

Stephan Stöckel, Susann Meisel, René Böhme, Mandy Elschner, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Effect of supplementary manganese on the sporulation of Bacillus endospores analysed by Raman spectroscopy**. Journal of Raman Spectroscopy, 40(11), 1469-1477 (2009).

### **Buchkapitel**

Stephan Stöckel, Angela Walter, Anja Boßecker, Susann Meisel, Valerian Ciobotă, Wilm Schumacher, Petra Rösch und Jürgen Popp. **Identification and Characterization of Microorganisms by Vibrational Spectroscopy**. In: Handbook of Biophotonics. J. Popp, V. V. Tuchin, A. Chiou, S. Heinemann (Eds.), Wiley-VCH Weinheim, Vol. 2 (Photonics for Health Care), 105-142 (2011).

### **Sonstige Publikationen**

Petra Rösch, Stephan Stöckel, Susann Meisel, Anja Boßecker, Ute Münchberg, Sandra Kloß, Wilm Schumacher und Jürgen Popp. **Bacterial identification in real samples by means of micro-Raman spectroscopy**. Proceedings of SPIE 2011, 8087 (Clinical and Biomedical Spectroscopy and Imaging II), 808708.

Petra Rösch, Stephan Stöckel, Susann Meisel, Ute Münchberg, Sandra Kloß, Dragana Kusic, Wilm Schumacher und Jürgen Popp. **A Raman spectroscopic approach for the cultivation-free identification of microbes**. Proceedings of SPIE 2011, 8311 (Optical Sensors and Biophotonics III), 83111B.

Jürgen Popp, Stephan Stöckel, Susann Meisel, Thomas Bocklitz, Wilm Schumacher, Melanie Putsche und Petra Rösch. **Raman spectroscopic characterization of single cells**. Proceedings of SPIE 2010, 7560 (Biomedical Vibrational Spectroscopy IV: Advances in Research and Industry), 75600B.

---

## Kapitel 4

### Konferenzbeiträge

S. Meisel, S. Stöckel, M. Elschner, F. Melzer, P. Rösch, and J. Popp. **Rapid identification of pathogenic milk contaminations.** At: *RKI FTIR Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, Berlin, Germany, 2011.

S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, M. Elschner, F. Melzer, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp. **PathoSafe: Mikro-Raman-Spektroskopie zur Detektion bioterroristisch relevanter Erreger.** At: *Workshop "Sicherheit durch innovative Detektionstechnologien"*, Berlin, Germany, 2011.

S. Meisel, S. Stöckel, M. Elschner, F. Melzer, P. Rösch, and J. Popp. **Micro-Raman spectroscopy – A promising tool to identify milk-borne pathogens.** At: *Association for General and Applied Microbiology (VAAM)*, Karlsruhe, Germany, 2011.

S. Meisel, S. Stöckel, M. Elschner, P. Rösch, and J. Popp. **Identification of pathogenic bacteria extracted from milk on single-cell-level by means of micro-Raman spectroscopy.** At: *XXII. International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS)*, Boston, USA, 2010.

S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, M. Elschner, F. Melzer, P. Rösch, and J. Popp. **Evaluation of various extraction methods for isolation of bacteria from milk and identification by means of Micro-Raman spectroscopy.** At: *Tagung der DVG-FG Bakteriologie und Mykologie*, Jena, Germany, 2010.

S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, M. Elschner, F. Melzer, P. Rösch, and J. Popp.  
**Evaluation of various extraction methods for isolation of bacteria from milk and identification by means of Micro-Raman spectroscopy.** At: *SPIE Photonics Europe*, Brussels, Belgium, 2010.

S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, M. Elschner, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp.  
**Raman spectroscopic studies on inactivated and milk-extracted microorganisms.** At: *RKI FTIR Workshop: FT-IR Spectroscopy in Microbiological and Medical Diagnostics*, Berlin, Germany, 2009.

S. Meisel, S. Stöckel, W. Schumacher, M. Elschner, M. Lankers, P. Rösch, and J. Popp.  
**Investigations on single microorganisms extracted from milk by means of micro-Raman Spectroscopy.** At: *5<sup>th</sup> International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS)*, Melbourne, Australia, 2009.



---

# Curriculum Vitae

## Persönliche Angaben

Name	Susann Meisel
Titel	Dipl.-Ing. (FH)
Geburtsdatum	15. 03. 1986
Geburtsort	Leipzig

## Kontaktinformationen

Wohnort	Kolberger Weg 3; 37083 Göttingen
Mobiltelefon	0173/8575767
E-Mail	susann.meisel@gmx.de

## Hochschullaufbahn

seit Nov. 2008	wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen einer Promotion am Institut für Physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena und am Institut für Photonische Technologie (IPHT) Jena
Okt. 2004 – Okt. 2008	Studium zum Diplom-Ingenieur (FH) im Fachbereich Medizintechnik (Studienrichtung: Pharma-Biotechnologie) an der Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena (Note: 1,7)
Feb. 2008 – Okt. 2008	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für physikalische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Note: 1,0) „Raman-spektroskopische Analyse von Endosporen“

## **Berufserfahrung/ Praktika**

02/2008 – 04/2008	Hilfswissenschaftler am Institut für Physikalische Chemie der Friedrich- Schiller-Universität Jena
08/2007 – 01/2008	Praktisches Studiensemester am Institut für physikalische Hochtechnologie (IPHT), Jena „Qualifizierbarkeit der Proteinchipanalyse mittels zeit- aufgelöster nativer Proteinfluoreszenz“
07/2006 – 09/2006	studentischer Mitarbeiter bei Siemens Com MN BM MI im Rahmen einer Werkstudententätigkeit, München
08/2005 – 09/2005	studentischer Mitarbeiter bei Siemens Com MN BM MI im Rahmen einer Werkstudententätigkeit, München
06/2004 – 10/2004	Institut für Neuwertwirtschaft, Verfahrensforschung- und Technologiecenter, Prüf- und Umweltlaboratorien, Rositz

## **Schulausbildung**

08/1996 - 06/2004	Lerchenberg-Gymnasium, Altenburg Abschluss: Abitur (Note 2,0)
08/1992 – 07/1996	staatliche Grundschule Treben, Treben

Jena, 16.10.2013

---

Susann Meisel

---

## Danksagung

Im folgenden Abschnitt möchte ich all denen danken, die dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit begonnen, durchgehalten und letztlich auch beendet habe.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Popp danke ich dafür, dass er mir die Möglichkeit zur Anfertigung einer Dissertation gegeben und mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Nicht nur das interessante Thema, sondern auch die vielseitigen technischen Ausstattungen seiner Arbeitsgruppe haben dazu beigetragen, dass ich die Freude am Forschen nicht verloren habe. Ich danke ihm außerdem, dass ich an zahlreichen Tagungen und Veranstaltungen im In- und Ausland teilnehmen durfte.

Frau Dr. Petra Rösch möchte ich für die fortwährende Betreuung und wegweisenden Diskussionen danken. Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Michael Schmitt für die Beratung und Unterstützung bei fachlichen und organisatorischen Dingen.

Für die anregenden Diskussionen, der unerschütterliche Glaube an unsere Methode und die unermüdliche Probenpräparation der pathogenen Erreger, die für reichlich Arbeit gesorgt hat, möchte ich mich bei den Kooperationspartnern und insbesondere bei Dr. Mandy Elschner, Katja Fischer und Falk Melzer vom Friedrich-Löffler-Institut bedanken. Die Arbeit in ihrem Institut und besonders im S3-Labor hat mich sehr fasziniert und mit Wissen bereichert.

Auch Herrn Dr. Pfister, Herrn Dr. Rödel, Herrn Dr. Kiehntopf und deren Arbeitsgruppen bin ich großen Dank verpflichtet, da sie die Arbeit in ihren Laboren des Instituts für klinische Mikrobiologie und des Instituts für klinische Chemie erlaubt haben. Besonders Svea Sachse möchte ich für die Beratung, Unterstützung und die

freundliche Aufnahme in ihr Umfeld danken. Es hat mir große Freude gemacht, mit euch zu arbeiten und zu Mittag zu essen.

Natürlich danke ich allen Mitgliedern der AG Popp für ein nettes Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und das stete Chaos, welches nicht nur Grundlage für viele amüsante Diskussionen war, sondern auch für die notwendige Bodenhaftung gesorgt hat.

Meinem Büro und der Mittagscrew (Anuradha Ramoji, Valerian Ciobota, Stephan Stöckel, Sandra Kloth, Melanie Becker-Putsche, Katharina Bräutigam, Anja Silge, Ralf Heinke, Ute Münchberg, Michael Kühnert, Evelyn Kämmer, Maximilian Bräutigam, Sophie Friedrich und Bernd Kampe) danke ich für offene Ohren, anregende und produktive Diskussionen, aber auch für gelungene Pausen. Schön, dass ich an euren Leben teilhaben durfte.

Ein großes Dankeschön an Katharina Hartmann, Melanie Becker-Putsche und Sandra Kloth! Ihr seid nicht nur gute Kolleginnen, sondern mittlerweile auch Freundinnen. Ich wünsche euch und euren Familien alles Gute.

Stephan Stöckel – DANKE für alles und vieles!

Danke an all diejenigen, die Jena für mich unvergesslich gemacht haben! Ich hatte eine unglaublich schöne Zeit!

Besonders meinen Mädels Ute Hofmann, Theresa Kunz und Kathleen Rönsch möchte ich für offene Ohren, Antrieb und so vieles mehr danken. Es ist toll, Freundinnen, wie euch zu haben.

Liebe Ute und lieber Thomas Hofmann – Danke, dass ihr mich so lieb bei euch aufgenommen habt! Ohne euch hätte ich wahrscheinlich noch viele schlaflose Nächte verbracht!

Vielen, vielen lieben Dank an meine ganze Familie, insbesondere meinen Eltern, Großeltern und meiner Schwester Sandra, die mich immer auf ihre eigene Weise unterstützt, motiviert und gefördert haben. Ich hab euch lieb! Danke Oma und Sandra, dass ihr euch mit meiner Arbeit intensiv auseinandergesetzt habt!

Danke Matthias Graupner, dass ich immer auf deine Unterstützung zählen kann. – Du bist mein Fels in der Brandung! Was würde ich nur ohne dich machen?

---

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Jena, 16.10.2013

---

Susann Meisel